

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Bakterite kinnitumine mikroseente niidistikule biofilmi näitel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Helery Hindriksoo

Juhendajad PhD Mari Pent

PhD Merike Jõesaar

TARTU 2023

## **Infoleht**

### **Bakterite kinnitumine mikrosete niidistikule biofilmi näitel**

Antud uurimistöö keskendub potentsiaalselt taime kasvu soodustavate ja taimepatogeenide vastu võitlemisel kasutatavate bakterite ja mikrosete omavaheliste interaktsioonide uurimisele. Tulemustest selgus, et töös kasutatud mikroseted olid eeldatavasti hüdrofoobse rakupinnaga, bakteritest olid hüdrofoobsed vaid *Rouxiella* sp. ja *Pseudomonas helleri*. Bakteritest oli parim biofilmi moodustaja *Pseudomonas koreensis*, mikrosetest kõik peale *Trichoderma* sp. Ükski bakter ei inhibeerinud *Trichoderma* sp. kasvu ja üleüldiselt inhibeerisid mikrosete kasvu tugevamalt rohkem biofilmi moodustavad bakterid. Kokkuvõtteks võib öelda, et bakterite kinnitumine sete hüüfidele sõltub nii konkreetsest seenest kui ka konkreetsest bakterist.

Märksõnad: Bakterid, mikroseted, biofilm, bioväetis

CERCS kood ja nimetus: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Bacterial attachment to the mycelium of microfungi on the example of biofilm**

This research focuses on studying the interactions between bacteria and microfungi potentially used for promoting plant growth and combating plant pathogens. The results revealed that the microfungi used in the study were expected to have hydrophobic cell surfaces, while only *Rouxiella* sp. and *Pseudomonas helleri* among bacteria exhibited hydrophobicity. Among the bacteria, *Pseudomonas koreensis* was the best biofilm former, while all microfungi except *Trichoderma* sp. were good at forming biofilms. None of the bacteria inhibited the growth of *Trichoderma* sp., and overall, the bacteria that formed biofilms more effectively inhibited the growth of microfungi more. In conclusion, the attachment of bacteria to fungal hyphae depends on both the specific fungus and the specific bacterium.

Keywords: bacteria, microfungi, biofilm, biofertilizer

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Bakterite ja seente interaktsioonid.....	7
1.2. Biofilm.....	8
1.2.1 Bakterite biofilm.....	10
1.2.2 Mikroseente biofilm .....	12
1.2.3 Bakteri ja mikroseene biofilm .....	14
1.3. Bakterite ja seente vastastikmõju .....	16
1.3.1 Seente-bakterite kahjulik vastastikmõju.....	16
1.3.2 Seente-bakterite kasulik vastastikmõju .....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärgid .....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1 Kasutatud bakterid ja mikroseened.....	21
2.2.2 Bakterite märgistamine GFP geeniga .....	23
2.2.3 MATH test.....	24
2.2.4 Biofilmi moodustamine .....	25
2.2.5 Vastandamiskatsed .....	26
2.2.6 Preparaadid mikroskopeerimiseks.....	26
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	28
2.3.1 MATH test.....	28
2.3.2 Bakterite ja mikroseente biofilmi moodustamine.....	30
2.3.3 Vastandamiskatsed .....	33
2.3.4 Bakterite kinnitumine mikroseente niidistikule.....	37
KOKKUVÕTE .....	42

Summary.....	44
KIRJANDUSE LOETELU.....	46
LISAD .....	61
LISA 1 .....	61
LISA 2 .....	62
LISA 3 .....	63
LISA 4 .....	65

## KASUTATUD LÜHENDID

BFI	bakterite ja seente vahelised interaktsioonid ( <i>bacterial-fungal interactions</i> )
c-di-GMP	tsükliline di-guansiin monofosfaat ( <i>cyclic di-guanosine monophosphate</i> )
ECM	ektomükoriisa ( <i>ectomycorrhiza</i> )
EPS	eksopolüsahhariid ( <i>exopolysaccharide</i> )
IAA	indool-3-atseethape ( <i>indole-3-acetic acid</i> )
MHB	mükoriisa-abistaja bakterid ( <i>mycorrhizal helper bacteria</i> )
QS	kvoorumitaju, hulgatunnetus ( <i>quorum sensing</i> )

## SISSEJUHATUS

Bakterite ja seente vahelised interaktsioonid (BFI) ja nende vastastikune regulatsioon on olulised nii ökosüsteemi toimimise, põllumajanduse kui tervishoiu seisukohalt, kuid seni on seda veel vähe uuritud (Nazir et al., 2009). BFI-sid uuritakse tavaliselt biofilmides, kus mõlemad mikroobid füüsiliselt suhtlevad, toodavad metaboliite ja reageerivad neile (Steffan et al., 2020). Bakterite ja seente biofilmid põhjustavad probleeme erinevates valdkondades ja keskkondades, näiteks joogivee jaotussüsteemides, mille tõttu halveneb vee kvaliteet, ja meditsiinis, kus saastunud seadmed põhjustavad erinevaid haiguseid ning nakkuseid (Seneviratne et al., 2008; Afonso et al., 2019). Põllumajanduses võivad aga biofilmid olla kasulikud taimepatogeenidega võitlemisel ja taimede kasvu soodustamisel. Üha enam pälvib tähelepanu põllumajanduslikult oluliste bakteri-seenekoosluste uurimine, sest seesugustel kooslustel on potentsiaalne mõju kliimamuutustega toime tulemisel, pinnase kvaliteedi ja taimede toitainete omastamise parandamisel, taimekaitses ning bioremediatsioonis (Velmourougane et al., 2017).

Ülemaailmne liigne sünteetiliste fungitsiidide kasutamine on tekitanud resistentsust ja avaldanud kahjulikku mõju kogu elusloodusele, sealhulgas inimestele ja loomadele, mis kõik omakorda toob kaasa suure kahjuliku ökoloogilise mõju (Gupta, 2018; Gupta 2019). Maailmas on tendents liikumas suunas, kus soovitakse vähendada keemiliselt sünteetisid pestitsiidide kasutamist ning üritatakse leida keskkonnasõbralikke alternatiive (Thambugala et al., 2020). Taimede pinnale moodustuvad mikroorganismide biofilmid loovad mikroniisi, mis erineb oluliselt ümbritsevast keskkonnast ja mõjutab otseselt taimehaiguste vastu võitlemist ning toiduohutuse tagamist (Morris ja Monier, 2003). Biofilmid võivad olla lahenduseks taimepatogeenidega võitlemisel, kemikaalide eemaldamisel loodusest ning põllumajandussaaduste saagikuse tõstmisel.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida varasemalt makroseente viljakehadest isoleeritud ja potentsiaalselt taimede kasvu soodustavate bakterite kinnitumist mullas laialt levinud mikroseente niidistikule biofilmi moodustumise näitel. Bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis ja Oecologicumis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Bakterite ja seente interaktsioonid

Bakterid ja seened elavad koos erinevates keskkondades – pinnas, taimed, veekogud ning võib ka juhtuda, et inimese kehas. Nende omavahelised interaktsioonid, positiivsed või negatiivsed, ei mõjuta ainult neid endid, vaid kõiki ning kõike neid ümbritsevat. Seetõttu on oluline mõista, kuidas ja mille kaudu bakterid ja seened interakteeruvad ning milline on nende interaktsioonide mõju nii neile kui neid ümbritsevale keskkonnale. Enne, kui mingi interaktsioon saaks toimuda, peavad mikroorganismid kõigepealt üksteise kohalolu tunnetama – see omakorda sõltub ümbritsevast keskkonnast, selle omadustest, teistest keskkonnas olevatest (mikro)organismidest ja teguritest. Üheks oluliseks teguriks on siinkohal ka mikroorganismi enda eripärad ja fenotüübilised tunnused. (Mandolini et al., 2021)

Bakterite ja seente vahelisi interaktsioone saab jagada kaheks: otsene kontakt ja molekulaarne kommunikatsioon. Otsene kontakt jaguneb omakorda pealtnäha ebakorrapärastest interaktsioonidest kõrgelt spetsiifiliste ühendusteni ja võib püsida mõnest hetkest pikema ajani. Molekulaarsed interaktsioonid hõlmavad aga keerulist ja mitmekesist kemikaalide ning ühendite kompleksi. (Mandolini et al., 2021)

Suuremal osal juhtudest bakterid liiguvad seenele lähemale kemotaksise mõjul (Steffan et al., 2020). Bakterid võivad olla hüfosfääris ehk hüüfe ümbritsevas alas erinevates olekutes: vabalt elavana, niidistikule kinnitunult, organiseeritud biofilmis või endofüütidena (Miquel Guennoc et al., 2018). Bakterite kinnitumisel mängib olulist rolli näiteks hüüfide elujõulisus – on leitud, et *Glomus* sp.-ga seostunud *Bacillus cereus* ja *Paenibacillus peoriae* kinnituvad kõige paremini mitteelujõulisele hüüfile, *Pseudomonas fluorescens* võib seostuda nii elavate kui elutute hüüfidega ning *Paenibacillus brasilensis* vajab kinnitumiseks elavat hüüfi (Toljander et al., 2006). Täiendavate uuringute põhjal võib väita, et elutud hüüfid võivad olla isegi paremad bakterite kinnitumiseks ja liikumiseks, sest siis ei tooda seen toksine, mis võivad pärssida bakteri kinnitumist (Steffan et al., 2020).

Üheks bakterite ja seente vaheliseks interaktsioonivormiks on biofilm.

## 1.2. Biofilm

Biofilmid on laialdaselt levinud ja neil on tähtis roll erinevates keskkondades - nii tööstuses, keskkonnas kui meditsiinis. Teades biofilmi moodustumisega seotud tegureid ja geene, võimaldab see teadmine välja töötada näiteks tõhusamaid strateegiaid kasutamaks biofilmi ja/või biofilmil põhinevaid komplekse säästvamas ja keskkonnasõbralikumas põllumajanduses ning teistes majandusharudes.

Mikroorganismid moodustavad biofilmi tavaliselt stressitingimustes, aga võivad moodustada ka selleks, et soodsas kohas paremini püsima jääda (Velmourougane et al., 2017). Biofilmi moodustumine sõltub spetsiifilistest ja mittespetsiifilistest molekulaarsetest ja füüsikalistest interaktsioonidest, mille mehhanismid pole veel täielikult teada (Pons et al., 2011; Ammar et al., 2015). Seega mõjutavad biofilmi moodustamist nt mullas paljud erinevad tegurid: mikroobide toodetud metaboliidid ja rakupind, pinnamaterjal, mulla omadused – sealjuures temperatuur, pH, toitainete, vee ja metallide olemasolu ning kindlasti ka teised mullas olevad organismid (Kour et al., 2020).

Biofilmis olevad mikroorganismid võivad läbi viia erinevaid bioloogilisi protsesse: fotosüntees, lämmastiku sidumine ja fermentatsioon ning biofilm annab mikroorganismidele suurema kaitse ja suurendab nende vastupanuvõimet (Davey ja O’toole, 2000; Stanley ja Lazazzera, 2004). Kuid kõigil biofilmis olevatel mikroobirakkudel pole seal ühtmoodi hea olla – rakud, mis on süvakihtides, ei saa nii palju toitaineid ja neil on raskem vabaneda kuhjuvatest jääkainetest, mis omakorda pärsib nende kasvu ning uute rakkude teket (Gjermansen et al., 2010).

B. Rosan oli üks esimesi uurijaid, kes biofilmi moodustumist kirjeldas mitmeastmelise protsessina, mis koosnes kolmest etapist: 1) mikroorganismide adsorptsioon pinnal, 2) rakkude kinnitumine substraadile ja polümeersete sildade moodustumine ning 3) mikroorganismide koloniseerimine ja jagunemine pinnal (Costerton, 1999; Lorite et al., 2011). Hiljem on seda protsessi kirjeldust korduvalt täiendatud ja modifitseeritud (Andryukov et al., 2020).

Biofilmi rakud on fenotüübiliselt ja metaboolselt erinevad planktonilistest rakkudest, mis on tingitud muutustest geeniekspressioonis ja regulatsioonis (Kuchma ja O’Toole, 2000; Whiteley et al., 2001). Lisaks võimaldab tihedam rakkude kontakt biofilmides kiiremat geneetilise materjali

ülekannet mikroorganismide vahel, mis toob kaasa suurema transformatsioonilise sageduse biofilmides võrreldes planktoniliste rakkudega (Hausner ja Wuertz, 1999; Li et al., 2001). Biofilmis on oluline rakkudevaheline suhtlus ja rakkude diferentseerumine (López et al., 2010; Asally et al., 2012).

Raku kinnitumist substraadile (biootiline/abiootiline) nimetatakse adhesiooniks, rakk-rakk seondumist nimetatakse agregatsiooniks (Boland et al., 2000). Agregatsioon aitab kaasa biofilmi edukamale moodustumisele, annab suurema liikidevahelise kaitse antimikroobsete ühendite vastu ning soodustab geneetilise informatsiooni vahetust mikroorganismide vahel (Gilbert et al., 2002; Perry et al., 2009). Mikroobide kinnitumist mõjutavad paljud tegurid: raku pinna hüdrofoobsus, väliste struktuuride olemasolu või puudumine ning raku poolt toodetud eksopolüsahhariidide (EPS) kogus ja kvaliteet (Donlan, 2002). Biofilm on piiratud polümeerse maatriksiga, milles olev EPS mängib olulist rolli biofilmi moodustumisel ja mikroorganismide kinnitumisel ning EPS-i maatriks muudab mikroorganismid vastupidavamaks ebasoodsatele tingimustele ka mullas (Bianciotto et al., 2001; Velmourougane et al., 2017). EPS on väga oluline veel peremehele kinnitumisel, kuna produtseeritud EPS-i kogusest sõltub adhesiooni tugevus mikroorganismi ja peremehe vahel (Velmourougane et al., 2017).

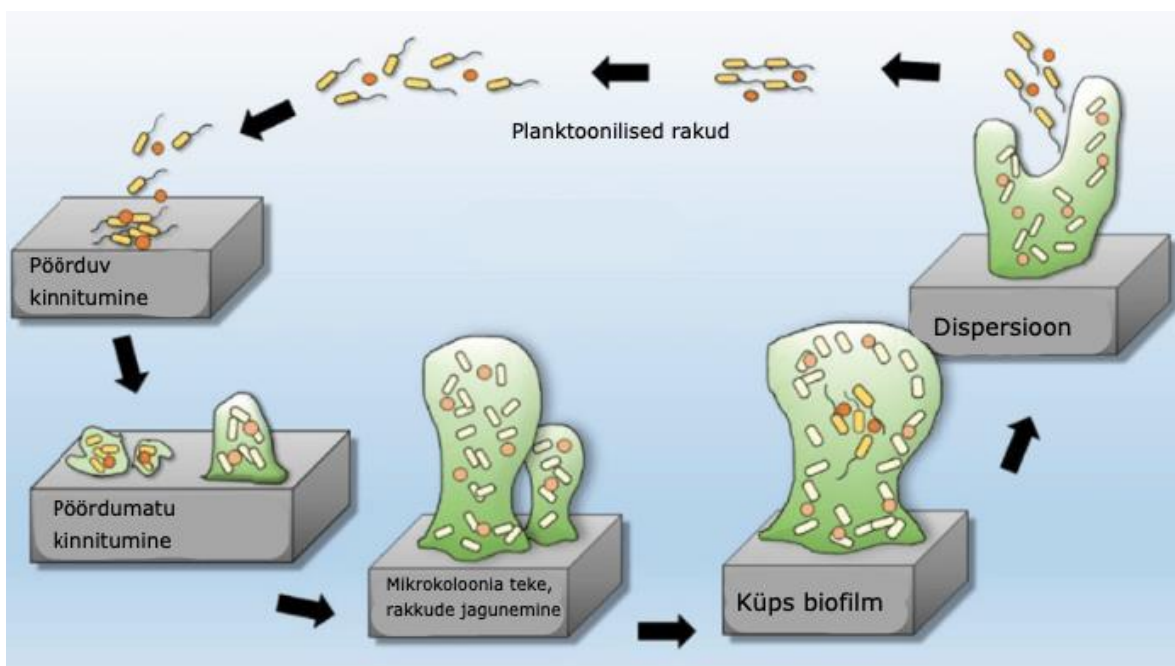
Hüdrofoobsed interaktsioonid on kõigist mittekovalentsetest interaktsioonidest tugevaimad ja pinnale kinnitunud bakterirakkude arvu ning pinna hüdrofoobsuse astme vahel on selgelt proportsionaalne lineaarne seos (Di Ciccio et al., 2015). Hiljutises Lamari et al. (2018) uurimuses leiti, et pinna hüdrofoobsus on mikroobirakkude adhesiooni määrav tegur. See kinnitas varasemate sarnaste uuringute tulemusi, mis näitasid hüdrofoobsuse rolli ja olulisust biofilmi moodustumise indutseerimisel (Guo et al., 2013; Carniello et al., 2018). Sellest tulenevalt kinnituvad mikroobid paremini hüdrofoobsetele ja mittepolaarsetele pindadele, võrreldes hüdrofiilsete pindadega (Flemming ja Wingender, 2001a; Flemming ja Wingender, 2001b). Hüdrofoobsusest sõltub paljude bakteri- ja seenpatogeenide peremehe koloniseerimise edukus ja bakterite ning seente vahelise biofilmi moodustumise võimekus (Doyle, 2000; Morales ja Hogan, 2010). Filamentsed seened produtseerivad väikeseid valke, hüdrofobiine, hüüfide ja koniidide rakuseinte välispindadel, mis vahendavad seene ja keskkonna vahelisi interaktsioone ning suurendavad seene hüdrofoobsust (Whiteford ja Spanu, 2002; Linder et al., 2005). Hüüfide hüdrofoobsuse iseloomustamine on oluline, mõistmaks selle mõju seen-bakteriaalsetes biofilmides (de Siqueira ja

Lima, 2011). Uurides *Pseudomonas aeruginosa* ja *Candida albicans*'i biofilmi leiti, et kui vähendada *C. albicans*'i hüüfide hüdrofoobsust, siis vähenes ka bakteri seondumine seenele (Steffan et al., 2020). Samuti on seene pinna hüdrofoobsus seotud erinevate funktsioonidega seoses seente kasvu ja arenguga ning sümbioosi korral (Linder et al., 2005; Siqueira ja Lima, 2012). Tähtis on ka see, et hüdrofoobsus võib muutuda olenevalt kasvukeskkonnast ning olekust (mitme liigi biofilm vs monokultuur) (Epstein et al., 2011). Lisaks hüdrofoobsusele mõjutab bakterite adhesiooni ja biofilmi moodustumise efektiivsust pinna karedus, mille suurenemine suurendab mikroobide kolonisatsiooni kiirust (Pons et al., 2011; Ammar et al., 2015).

### 1.2.1 Bakterite biofilm

Kuna biofilmis olevatel bakteritel on mitmekordne eelis biotilise ja abiotilise stressi resistentsuse suhtes, on paljudel bakteritel välja kujunenud võime moodustada biofilmi nii abiotilistel pindadel (meditsiiniseadmed, veetorud) kui ka eluskudedel (epiteelirakud) (Guennoc et al., 2018).

Bakterite biofilmi moodustumine on keeruline protsess, mis koosneb erinevatest etappidest (Joonis 1): pöörduv ja pöördumatu kinnitumine, mikrokoloonia teke, küps biofilmi moodustumine ning lõpuks biofilmi hajumine ja rakkude vabanemine, mis võib omakorda algatada uue biofilmi moodustumise (Stoodley et al., 2002).



Joonis 1. Biofilmi moodustumise etapid (modifitseeritud joonis; Bin Abu Bakar et al., 2018)

Bakteri ja pinna esmane kokkupuude ehk pöörduv kinnitumine on juhuslik ja seal mängivad olulist rolli rakuvälised struktuurid, näiteks piilid, nendes olevad adhesiini valgud, pinna omadused ning erinevad tõmbe- ja tõukejõud (Artyushkova et al., 2015; Naskar ja Kim, 2019; Andryukov et al., 2020). Pöörduvale kinnitumisele järgneb pöördumatu adhesioon, mille käigus suureneb EPS-i tootmine märkimisväärselt ja kontaktjõud nõrgast rakk-rakk interaktsioonist muutub tihedaks ning tugevaks sidemeks (Stoodley et al., 2002).

Bakterid toodavad erinevaid EPS-e: näiteks dekstraani, tselluloosi, alginaati ja sageli seostatakse EPS-i ka erinevate metallioonide, DNA, lipiidide ning valkudega (Flemming ja Wingender, 2010; Velmourougane et al., 2017). Biofilmi küpsemisel moodustab algselt lahustuv EPS filamentse maatriksi, mis kiirendab rakkude agregatsiooni ja suurendab toitainete jaotumist bakterite vahel (Velmourougane et al., 2017).

Viimastel aastatel on leitud, et biofilmi moodustumise ja edasise rakkude migratsiooni käigus moodustavad bakterid tihedaid agregeeritud klastreid (Andryukov et al., 2020). Agregaaadi keskel paiknevad rakud proliferuuvad, samas kui välimised rakud vastutavad koloonia toitumise, signaalmolekulide vastuvõtmise, keskkonnaparametrite jälgimise ja maatriksi sünteesi eest (Yazdi ja Ardekani, 2012; Melaugh et al., 2016). Tekkinud tütararakud liiguvad väljapoole, luues seenekujulise biofilmi, mis aitab kaasa toitainete ühtlasemale jaotamisele (Vu et al., 2009; Limoli et al., 2015). Algselt sõltub rakkude jagunemine toitainete olemasolust, hiljem aga peamiselt biofilmi sees toimuvatest bioloogilistest protsessidest (Cattò ja Cappitelli, 2019).

Bakterite kinnitumine pinnale ja biofilmi moodustamine on rangelt reguleeritud protsessid, mis sõltuvad erinevatest molekulidest ja regulaatorsetest radadest, mis omakorda kontrollivad geeniekspressiooni (O'Toole ja Kolter, 1998; Prigent-Combaret et al., 2001). Rakkude kasvukiirus ja tihedus biofilmis on kontrollitud kvoorum-i tunnetus süsteemi (*QS*) poolt toodetud signaalmolekulide kaudu, mis reguleerib bakterikoosluse liikmete kollektiivset käitumist biofilmi kõigis etappides, tagades rakkudevahelise interaktsiooni protsesside järjepidevuse, samuti geeniekspressiooni muutused biofilmi tekke alguses (Hu et al., 2019; Jiao et al., 2019; M. Wang ja Tang, 2019).

c-di-GMP (tsükliline di-guanosiin monofosfaat) määrab aga selle, kas rakk jääb planktonilisse või läheb üle sessiilsesse olekusse (Römling et al., 2005; Wolfe ja Visick, 2008; Velmourougane et al., 2017). Lisaks on c-di-GMP seotud viburi liikuvuse ja EPS-i sünteesimisega (Ross et al., 1987; Ryjenkov et al., 2006). Oluline on ka geeniekspressiooni üles- ning allareguleerimine biofilmi moodustumisel (Velmourougane et al., 2017). Erinevate geenide ekspressioon ja molekulide olemasolu või puudumine ei mõjuta kõiki biofilmi protsesse ühtemoodi. Näiteks mängib eDNA olemasolu olulist rolli bakterite algsete kinnitumisprotsesside juures, kuid sellel on vähene mõju küpsele biofilmile (Tang et al., 2013).

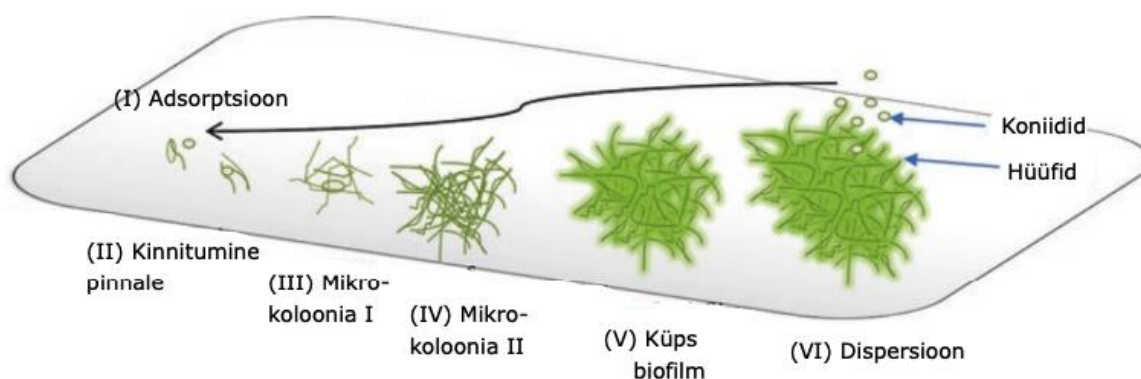
### 1.2.2 Mikrosete biofilm

Kirjanduses on vähem uurimistöid filamentsete mikrosete biofilmi moodustumise kohta võrreldes bakteritega, kuid on teada, et leidub nii sarnasusi kui erinevusi. Erinevusi eelkõige seetõttu, et seentel on palju omadusi, mis bakteritel puuduvad: toitumine heterotroofilise imendumise teel, reproduktiivsete ja vegetatiivsete struktuuride ehk eoste ja hüüfide areng, suguline ja mittesuguline paljunemine, invasiivne kasv läbi substraadi ning eoste levik läbi õhu (Gulis et al., 2008; Siqueira ja Lima, 2013). Siiski on leitud, et filamentssed mikroseted kasvavad biofilmidena valdavalt suure niiskustasemega erinevates keskkonna-, meditsiini- ja tööstuslikes tingimustes (Simões et al., 2015; Afonso et al., 2019).

Harding et al. (2009) esitasid algse kuueastmelise mudeli biofilmi moodustumise kohta filamentsete seente poolt, tuginedes eelnevalt avaldatud kirjeldustele sellistest biofilmidest ja võttes arvesse bakteri- ja pärmimudeleid (joonis 2): adsorptsioon, aktiivne kinnitumine pinnale, mikrokoloonia moodustumine I, mikrokoloonia moodustumine II ehk algne küpsemine, küpsemine ehk paljunemine, hajumine ehk planktoniline faas (Afonso et al., 2019). Väga olulised on seente biofilmi moodustumise juures rakk-substraat ja rakk-rakk interaktsioonid, hüüfide diferentseerumine ja rakuvälise maatriksi tootmine (Blankenship ja Mitchell, 2006).

Adhesiooniprotsessi on mikrosetel kirjeldatud kaheetapilise protsessina. See hõlmab idanemata koniidide esialgset kinnitumist, millele järgneb arenevate idutorude ja kasvavate hüüfide edasine adhesioon (Priegnitz et al., 2012). Termin "biofilm" kasutamine filamentsete seente kohta tekitab lahkarvamusi, sest see ei seostu invasiivse kasvuga – siiski läbib näiteks seenelise biofilmi

moodustamise mudelorganism *C. albicans* morfoloogilise diferentseerumise filamentseks (sageli invasiivseks) vormiks, mis võib olla vajalik tugeva biofilmi arenguks ja sageli ka peremeesorganismi kudede invasiooniks ja virulentsuseks (Douglas, 2003; Blankenship ja Mitchell, 2006). Bakterite biofilmi moodustamisel on väga oluline roll QS-il, mida *C. albicans*'i ja *S. cerevisiae* puhul on küll täheldatud, kuid mikrosete biofilmi moodustamisel nii oluliseks ei peeta (Hogan, 2006; Sprague ja Winans, 2006). Küll aga on Harding et al. (2009) artiklis välja toodud mitmeid näiteid, kuidas filamentsed seened on võimelised populatsiooni tasemel suhtlema difundeeruvate rakuväliste signaalide kaudu, et koordineerida muutusi geeniekspressioonis, morfoloogias ja arengus.



Joonis 2. Filamentsete seente biofilmi moodustumise mudel: (I) adsorptsioon, (II) aktiivne kinnitumine pinnale, (III) mikrokoloonia I, (IV) mikrokoloonia II (mütseeli areng), (V) küpse biofilmi areng ning (VI) dispersioon ehk planktoniline faas (modifitseeritud; Harding et al., 2009).

### 1.2.3 Bakteri ja mikrosete biofilm

Bakterite ja filamentsete seente omavahelised biofilmid erinevad nendest biofilmidest, mida bakter või seen üksi moodustavad (Seneviratne et al., 2008). Sellise biofilmi moodustamisel mängivad rolli nii rakuvälised struktuurid, lipopolüsahhariidid kui muud membraanivalgud, näiteks adhesiinid (Velmourougane et al., 2017). Bakterite ja seente vahelisi interaktsioone vaadetaksegi tavaliselt biofilmis, kuna seal toimub nii füüsiline interaktsioon kui ka reageerimine üksteise metaboliitidele. Füüsiline kokkupuude põhineb tavaliselt sellel, et seen on bakteri jaoks nagu tugistruktuur, millel bakter võib asuda nii seene peal kui sees – see sõltub konkreetsetest mikroobidest (seenest ja bakterist), mikroobide pinnamolekulidest ning kasvusubstraadist. (Steffan et al., 2020)

Kuna EPS-e leidub seentes palju, võivad need mängida olulist rolli bakterite ja seente vaheliste biofilmide moodustumisel (Haq et al., 2014). Olulist rolli on täheldatud ka kitinaasil – on leitud baktereid, mis ei kinnitu seeneniidistikule, kui neil puudub kitinaas, millega lagundada seene pinnal olevat kitiini (Jagmann et al., 2012; Haq et al., 2014).

Mitme liigi biofilmides moodustavad üksikud liigid tihti oma biofilmi, millega mõjutavad üksteist metaboolset (Elias ja Banin, 2012). Nii bakterite kui seente toodetud erinevad sekundaarsed metaboliidid on nende omavaheliste interaktsioonide olulisteks signaalmolekulideks (Frey-Klett et al., 2011; Bitas et al., 2013). Veelgi enam, üks liik võib toota metaboliite, mis muudab teise liigi resistentsemaks teatud keskkonnale või teguritele (Velmourougane et al., 2017). Seen võib eritada erinevaid metaboliite ja ühendeid, nagu trehhaloos või mannitool, et meelitada ligi bakterit, mis hakkaks hüüfidel biofilmi moodustama (Frey-Klett et al., 2011). Lisaks võib trehhaloos olla oluline komponent bakterite kasvuks koos seentega, seenerakke kahjustamata (Hogan et al., 2009). Võimalik, et seen eritab kindlat ühendit, et ligi meelitada mingit spetsiifilist bakterit (Rangel-Castro et al., 2002).

ECM (ektomükoriisa) seened interakteeruvad bakteritega kogu oma elutsükli vältel ja nende niidistik pakub elupaika erinevatele bakterikooslustele (Guennoc et al., 2018). Mitmed uuringud on näidanud, et bakterid võivad biofilmi moodustada *in vitro* tingimustes nii *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* kui *Zygomycetes* hõimkondadesse kuuluvate seente hüüfidel (Scheublin et al., 2010; Lear ja Lewis, 2012; Nazir et al., 2014; Miquel Guennoc et al., 2018). Miquel Guennoc et al. (2018) uuringus selgus, et kuigi enamikel mullabakteritel on võime moodustada biofilmi ECM seente hüüfidele, leidis siiski seeni, mis ei lasknud bakteritel oma pinnale biofilmi moodustada. Lisaks on bakteritel, näiteks *Bacillus subtilis*'el, leitud geene, mille puudumisel pole bakter võimaline seeneniidistikule kinnituma ega biofilmi moodustama (Kjeldgaard et al., 2019). Võib oletada, et see on relevantne ka teiste bakterite puhul.

Mitmeliigilised biofilmid on potentsiaalselt võimekamad kui üheliigilised biofilmid. Näiteks suudab bakter *Rhizobium* sp. ühtses biofilmis koos seenega fikseerida lämmastikku, kuid mitte monokultuuris kasvades (Jayasinghearachchi ja Seneviratne, 2004). Seneviratne et al. (2008) artiklis on samuti näidatud, et bakterite ja seente biofilmid on bioloogiliselt tõhusamad kui monokultuurid, kuid ka seal nenditakse, et tulevikus tuleks teha rohkem uuringuid, et optimeerida

erinevate mikroobsete biofilmide kasutamist ja tuleks leida kõrgeima efektiivsusega mikroobide kombinatsioonid. Peale selle, mõistes bakterite ja seente biofilmide moodustumist, on võimalik tuvastada rohkem biofilmide olulisi komponente teistel eluspindadel, nagu näiteks taimedel ja imetajate kudedel (Hogan et al., 2009).

### 1.3. Bakterite ja seente vastastikmõju

Erinevates uuringutes ja artiklites on näidatud nii positiivseid, negatiivseid kui ka neutraalseid interaktsioone bakterite ja seente vahel. Kuna kasvukeskkonnast ja toitainetest sõltub suurel määral organismide ellujäämine, on mõned liigid suutnud välja töötada ja luua mehhanismid, mis võimaldavad neil mitmekesi paremini hakkama saada. Samal põhjusel on aga erinevad organismid võimelised ka teiste kasvu ja elutegevust pärssima, et endale piisavalt toitaineid saada ja sobiv elupaik säilitada – nii on see ka bakterite ja seente puhul.

#### 1.3.1 Seente-bakterite kahjulik vastastikmõju

Seente ja bakterite vahelisi antagonistlikke suhteid on sageli edukalt kasutatud põllumajanduses biotõrje eesmärgil. Antagonistid võivad taimepatogeenidega võitlemisel kasutada nii otseseid kui kaudseid mehhanisme: antibioos (inhibeeriva metaboliidi või antibiootikumi tootmine), mükoparasitism (kus antagonist saab osa või kõik oma toitained seenperemeesorganismilt), indutseeritud resistentsus (taimede kaitsereaktsiooni esilekutsumine taimepatogeenide vastu) ja kasvu kiirendamine (soodustavad taime kasvu, samal ajal kui haiguse mõju väheneb) (Thambugala et al., 2020). On ka baktereid, näiteks *P. aeruginosa*, mis võivad negatiivselt mõjutada seent nii kontaktist sõltuva mehhanismi kui ka kontaktist sõltumatu mehhanismi kasutamise, viimane hõlmab erinevate ühendite sekretsiooni (Rella et al., 2012). On mitmeid näiteid, kus bakterid koloniseerivad seene sisemiselt või väliselt ja hiljem lüüsiivad selle, et bakterirakud saaksid keskkonda vabaneda või toodavad bakterid seenevastaseid ühendeid, mille tõttu seene rakud kas lüüsiivad või lekivad, tänu millele saavad bakterid toitaineid (Kobayashi ja Crouch, 2009; Nazir et al., 2009).

Mullas olevad bakterid toodavad väga palju erinevaid antibiootilise toimega sekundaarseid metaboliite, mis annavad neile konkurentsieelise võrreldes teiste bakterite, seente ning taimedega (Nielsen et al., 1998; Kobayashi ja Crouch, 2009). Seened võitlevad bakterite antibiootilise toimega metaboliitide vastu aktiivse resistentsusega või erinevate signaalmolekulidega, mis pärssivad bakterite metaboliitide tootmist (Duffy et al., 2003). Peale selle toodavad seened ise sageli antibakteriaalse toimega ühendeid ja on välja töötanud mitmeid strateegiaid bakteriaalse antagonismi vastu võitlemiseks, sealhulgas detoksifitseerimine, antibiootikumide eemaldamine

väljavoolu teel ja bakteriaalse geeniekspressiooni muutmine (Duffy et al., 2003). Näiteks on *Candida albicans*'il ja *Pseudomonas aeruginosa*'l avastatud vastastikmõju, kus mõlema QS molekulid mõjutavad teineteist – *P. aeruginosa* QS molekulid takistavad *C. albicansi* filamentse ehk patogeense vormi teket ning *C. albicans*'i QS molekulid takistavad *P. aeruginosa* QS molekulide tootmist (Hogan et al., 2004; Cugini et al., 2007). Sellest tulenevalt on nii seen kui bakter võimeline mõjutama teise mikroorganismi biofilmi moodustamise võimekust (MacAlpine et al., 2023). Lisaks on leitud, et bakterid saavad teatud määral reguleerida seenpatogeenide virulentsust peremeesorganismis ja samuti mõjutada peremeesorganismi vastust patogeenidele. Seened on ka võimelised soodustama bakterite erinevaid virulentseid omadusi ja vastupidi (MacAlpine et al., 2023).

Kuid nagu eelpool mainitud, siis peale erinevate metaboliitide tootmise võivad bakterid ka füüsiliselt seene kasvu pärssida või seene hävitada. Näiteks oli *Serratia marcescens* võimeline migreeruma mööda hüüfe, moodustades kinnitunud mikrokolooniad, mis ühinedes moodustasid biofilmi, mis hüüfe kattes lõpuks niidistiku hävitas (Tal et al., 2016). Peale selle on mitmed uuringud dokumenteerinud bakterite poolset mükofaagiat ehk bakterite toitumist nii elusatest kui surnud seente hüüfidest (Bodé et al., 2013; Rudnick et al., 2015). Selle vastu toodavad seened näiteks defensiine, et takistada bakteritel hüüfide koloniseerimist (Essig et al., 2014). Seente defensiinid on erinevad antimikroobsed peptiidid, mis võivad kas lõhkuda bakteri rakumembraani või pärssida bakteri rakumembraani biosünteesi (Schneider et al., 2004; Schneider et al., 2010).

### **1.3.2 Seente-bakterite kasulik vastastikmõju**

Viimased aastakümned on bakterite ja seente vaheliste interaktsioonide uuringud keskendunud mükoriisasüsteemidele, millest varasemad teated olid fluorestseeruvate pseudomonaadide positiivsest mõjust ektomükoriisa tekkele ning tänu sellele nimetati neid baktereid "mükoriisa-abistaja bakteriteks" (MHB) (Grube ja Berg, 2009). Üheks positiivseks mõjuks võib pidada bakterite eritatud sidrun- ja õunhapet, mis stimuleerivad mükoriisa kasvu ja juurte kolonisatsiooni (van Overbeek ja Saikkonen, 2016; Venturi ja Keel, 2016). Ühed levinumad bakterid seente pinnal ongi pseudomonaadid, kellel on avastatud seene ja taime kasvu soodustavaid omadusi ja on näiteks leitud, et *P. fluorescens*'i võime tomatitaime koloniseerida ning tõhusalt kaitsta suurenes

märkimisväärselt koos seenega biofilmis olles (Boer et al., 2005; Jayasinghearachchi ja Seneviratne, 2010).

Seen võib bakteritele pakkuda sobivat mikronišsi ja samal ajal saada ka ise bakteritega interakteerumisest kasu. Filamentsed seened liiguvad mullas edasi kasvatades hüüfe järjest pikemaks, et pääseda ligi kaugematele toitainete ressursidele (Mandolini et al., 2021). Bakterid kasutavad seeneniidistikku ja kasvavaid hüüfe nn seente maanteena, et samuti mullas edasi soodsamasse keskkonda liikuda (Kohlmeier et al., 2005). Seened võivad seeläbi kasu saada neile kinnitunud ja neid ümbritsevatest bakteritest, kasutades baktereid hiljem toitainete allikana või kaitseks stressi eest (Pion et al., 2013). Abeysinghe et al. (2020) uurimistöös kirjeldati vastastikku kasulikku kooselulist mehhanismi filamentse seene *Aspergillus nidulans* ja bakteri *Bacillus subtilis* vahel, kus seeneniidistik annab bakteritele parema võimaluse migreeruda, hajuda ja paljuneda ning vastutasuks varustasid bakterid kasvavaid hüüfe tiamiiniga, mis soodustas hüüfide kasvu (Thambugala et al., 2020).

Peale selle on näidatud, et tänu seente hüüfidele saavad bakterid toitaineid ja vett, samas suudavad bakterid aktiveerida seente mitteaktiivsete geenide transkriptsiooni, mis omakorda soodustab seente sekundaarsete metaboliitide sünteesi (Nützmann et al., 2011; Worrich et al., 2017). Lisaks võib aidata edukas interaktsioon kaasa seene kasvule ja/või eoste tekkele – *Rhizopus microsporus* ja *Mycetohabitans rhizoxinica* vahelise interaktsiooni tulemusena hakkab seen tootma eoseid, mis on vajalikud sümbioosi tekkeks ja see omakorda aitab kaasa mõlema liigi säilimisele mitmeid põlvkondi (Partida-Martinez et al., 2007; Steffan et al., 2020). Bakterite kogukonnad võivad kasu saada saprotroofsete seente poolt toodetud rakuvälistest ensüümidest ja saprotroofsete seente kasvust, lagundades ise näiteks samas toksilisi ühendeid või polüsahhariide, mis pärsivad seene kasvu või sidudes ja varustades seent lämmastikuga, aidates nii kaasa seente poolt läbiviidavatele lagundamisprotsessidele (Boer et al., 2005; Clausen, 1996; Hoppe et al., 2014).

Hiljutistes töodes on näidatud erinevate bakteritüvede võimet indutseerida geeniekspressiooni ektomükoriisa seentes (Schrey et al., 2005). Veelgi enam, on avastatud seeni, mis vajavad sporuleerumiseks, peremeesorganismi koloniseerimiseks, toitainete omastamiseks või virulentsuseks bakteriga endosümbioosi (Partida-Martinez et al., 2007; Kobayashi ja Crouch, 2009). Endobakterid esindavad kõige ekstreemsemat ja spetsialiseerunud tüüpi bakteri-seene

interaktsiooni, kuna enamikel juhtudel on need bakterid kaotanud võime elada iseseisvalt genoomi vähenemise tõttu, millest tulenevalt vajavad bakterid elamiseks seene tsütoplasmat (Bonfante ja Desirò, 2017; Deveau et al., 2018; Pawlowska et al., 2018). On leitud, et seente sees elavad endobakterid võivad toota antibiootikume, mis annavad seenele resistentsuse erinevate antimikroobsete ühendite suhtes ja suurendavad seeläbi konkurentsivõimet (del Barrio-Duque et al., 2020).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Bakterid ja seened moodustavad koosluseid, mis on olulised nii põllumajanduses kui meditsiinis, mõjutades ka inimese heaolu. Uurides seente ja bakterite füüsilise koostoime mehhanisme, saame teadmisi kuidas seened ja bakterid kooslusena toimivad, mis võimaldab arendada efektiivseid meetodeid nii võitlemaks patogeenidega (põllumajanduses kui meditsiinis) kui ka bioväetiste tootmiseks.

Antud uurimistöös uuriti seitset seente viljakehadest isoleeritud bakterit ja nelja põllu mullast isoleeritud mikroset. Töö põhieesmärgiks oli uurida potentsiaalselt taimede kasvu soodustavate bakterite kinnitumist mullas laialt levinud mikrosete niidistikule, et saada teadmisi mikroseten-bakter kompleksidel põhinevate bioväetiste arendamiseks tulevikus. Sellest tulenevalt käesoleva uurimistöe eesmärkide täitmiseks:

- 1) määrati mikroorganismide rakupinna hüdrofoobsus;
- 2) analüüsiti mikroorganismide biofilmi moodustamise võimekust;
- 3) testiti bakterite võimalikku antagonistliku/mitteantagonistliku toimet mikrosete suhtes;
- 4) tuvastati, millised bakterid milliste mikrosete niidistikule kinnituvad ja milline roll on selles mikroorganismide rakupinna hüdrofoobsusel/hüdrofiilsusel, biofilmi moodustamise võimel ja bakterite-seente omavahelistel antagonistlikel/mitteantagonistlikel suhetel.

## 2.2. Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud bakterid ja mikroseed

Töös kasutatud bakteritüved on algselt isoleeritud kandseente viljakehadest (Tabel 1) vastavalt artiklis Pent et al. (2017) kirjeldatud meetodikale ja on deponeeritud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis asuvas looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonis (CELMS - Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains). CELMS-i andmebaas asub aadressil <http://eemb.ut.ee>. Kasutatud bakteritüvedel on erinevate testide abil ja spetsiifilisi söötmeid kasutades tuvastatud mitmeid potentsiaalselt taimede kasvu soodustavaid omadusi, nagu võime vabastada fosforit ja kaaliumit, muutes need taimedele paremini kättesaadavaks või toota taimede kasvufaktorit indool-3-atseethapet (IAA; avaldamata käsikiri).

Seened on isoleeritud põllumullast (57°58'34.0"N, 27°12'16.0"E) lahjenduskülvi meetodil (Gaddeyya et al., 2012), kasvatades neid maltoosi ekstrakti agaril (MEA) ja pärast puhaskultuuri viimist sekveneeritud kasutades primereid ITS0F ja LR5 (avaldamata käsikiri).

Bakterid on identifitseeritud 16S rRNA geeni ja seened LSU ja ITS järjestuste põhjal Mari Pent poolt.

Tabel 1. Uurimistöös kasutatud bakteritüved ja nende päritolu ehk seen, mille viljakehadest on bakter algselt isoleeritud.

Bakter	Tüve number	Päritolu
<i>Pseudomonas trivialis</i>	MP140	<i>Craterellus lutescens</i> (kollakas torbikseen) viljakehadest – ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	MP170	<i>Cantharellula umbonata</i> (kühmkantarellik) viljakehadest – saprotroofne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened
<i>Pseudomonas helleri</i>	MP233	<i>Craterellus tubaeformis</i> (lehter-kukeseen) viljakehadest – ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened
<i>Rouxiella</i> sp.	41	<i>Suillus variegatus</i> (liivtatik) viljakehadest – ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened

<i>Rahnella</i> sp.	MP245	<i>Craterellus tubaeformis</i> (lehter-kukeseen) viljakehast – ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened
<i>Pseudomonas koreensis</i>	255	<i>Cantharellus cibarius</i> (harilik kukeseen) viljakehast - ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MP244	<i>Cantharellus cibarius</i> (harilik kukeseen) viljakehast - ektomükoriisne seen hõimkonnast <i>Basidiomycota</i> ehk kandseened

Tabel 2. Uurimistöös kasutatud mikroseed.

Seen	Tüve number	Iseloomustus
<i>Clonostachys rosea</i> (saprotroofne seen hõimkonnast <i>Ascomycota</i> ehk kottseened)	A18	Tugev bioloogiline tõrjevõime paljude taimede suhtes patogeensete seente, nematoodide ja putukate vastu (Sun et al., 2020)
<i>Mortierella alpina</i> (saprotroofne seen hõimkonnast <i>Mortierellomycota</i> )	A10	Võib leevendada seenpatogeeni põhjustatud haigusi, mõjutab taime ligi tõmbama taime kasvu soodustavaid baktereid ja suurendab mulla lämmastiku- ja fosforisisaldust (Y. Wang et al., 2022)
<i>Trichoderma</i> sp. (saprotroofne seen hõimkonnast <i>Ascomycota</i> ehk kottseened)	A34	Avastatud 25 biotõrjeainet, mida on juba kasutatud biotõrjevahendina põllumajanduses (Menzler-Hokkanen, 2006; Thambugala et al., 2020)
<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> (saprotroofne seen hõimkonnast <i>Ascomycota</i> ehk kottseened)	A42	<i>Paraphaeosphaeria</i> perekonnas on nii bioremediaatoreid, biokontrolli aineid tootvaid kui ka endofüütilisi seeni, mis toodavad erinevaid seenevastaseid ja tsütotoksilisi ühendeid (Verkley et al., 2014; T. Liu et al., 2017). <i>P. sporulosa</i> toodab ka metaboliite, mis tagavad tema antibakteriaalsed omadused (Chen et al., 2022)

### 2.2.2 Bakterite märgistamine GFP geeniga

Bakteritüvede märgistamiseks kasutati (Koch et al., 2001) poolt välja töötatud meetodikat, milles kasutati elektroporeerimisel pBK-miniTn7-*gfp* plasmidi, mis sisaldab lisaks gentamütsiini resistentsusgeeni (Lambertsen et al., 2004). Antud plasmid vajab bakteri rakku sisenemiseks abi-plasmidi pUXBF13 (Bao et al., 1991). Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati bakterirakke üleöö 30 °C loksutil 1,5 ml LB-puljongis. Üleöö kasvanud rakud eraldati tsentrifuugimise teel (1 min, 13 400 rpm, Eppendorf miniSpin). Peale supernatandi eemaldamist pesti kõiki teisi baktereid peale *Rahnella* sp. ja *Rouxiella* sp. 3 korda 300 mM steriilse toatemperatuuril oleva sahharoosi lahusega. Viimaks suspendeeriti rakud üles 200 µl 300 mM sahharoosi lahuses. *Rahnella* sp. ja *Rouxiella* sp. üleöö kasvanud rakud lahjendati LB söötmel optilise tiheduseni  $A_{580}=0,1$  ja kasvatati loksutil 2 tundi 37 °C juures, seejärel hoiti rakke kompetentsuse saavutamiseks 10 minutit jääl, pesti 3x 1 ml külma destilleeritud veega ning viimaks suspendeeriti rakud 40 µl külmas glütseroolis. Uude epsi lisati 60 µl kompetentseid rakke või 40 µl *Rahnella* sp.-d ja *Rouxiella* sp. kompetentseid rakke, 2,5 µl abi-plasmidi pUXBF13 ning 2,5 µl pBK-miniTn7-*gfp* plasmidi. Elektroporatsioon teostati elektroporaatoriga BioRad 2500 V juures. *Rahnella* sp. ja *Rouxiella* sp. jaoks kasutati külma elektroporatsiooniküvetti, teistel tüvedel toatemperatuuril olevaid küvette. Seejärel valati elektroporeeritud rakud 1,5 ml LB-puljongisse ja pandi 30 °C loksutisse 2 tunniks, *Rahnella* sp. ja *Rouxiella* sp. rakke kasvatati 37 °C juures. 2 tunni möödumisel tsentrifuugiti rakud põhja (3 min, 8000 rpm) ja eemaldati vedelikku nii palju, et alles jäi ca 100 µl. Rakud suspendeeriti 100-s µl-s ühtlaseks suspensiooniks ja segu plaaditi LB+gentamütsiini tassile (gentamütsiini lõppkontsentratsioon 10 µg ml<sup>-1</sup>) ning kasvatati üleöö 30 °C juures. ~ 48 tunni möödumisel valiti tassilt välja 5-7 kolooniat, millesti tehti joonkülv uuele LB+Gm tassile ja kasvatati üleöö 30 °C juures. 24 tunni möödumisel valiti välja 3 kolooniat UV valguslual (Syngene™ LED Blue Light Transilluminator), millest tehti preparaadid mikroskopeerimiseks. Mikroskopeerimiseks kasutati fluorestsentsmikroskoopi Olympus BX41 (ergastuse ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 480 ja 500 nm). Mikroskopeerimisel valiti kõige paremini fluorestseeruv koloonia, mida kasutati edasises töös.

### 2.2.3 MATH test

Bakterite ja seente rakupinna hüdrofoobsuse määramiseks kasutati Rosenberg et al. (1980) modifitseeritud MATH testi. Selleks kasvatati bakterirakke 20 ml R2A söötmes (pärmiekstrakt, peptoon, CAA, glükoos, tärklis, Na-püruvaat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>) 18h, 24h ja 48h (seenerakke 18h) 30 °C juures. Seejärel eraldati rakud tsentrifuugimise teel (20 min, 5000 rpm). Peale supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud steriilses 5 ml PUM puhvris (22,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O; 7,26 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,8 g urea, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O/1l; pH 7,1) ning tsentrifuugiti (12 min, 5000 rpm). Rakkude pesemist korrati kokku kaks korda ja rakud suspendeeriti lõpuks 3 ml PUM puhvris. Seejärel mõõdeti spektrofotomeetriga (Libra S22, Biochrom) lainepikkusel 580 nm mikroobisuspensiooni optiline tihedus ja valmistati sellest suspensioon, mille A<sub>580nm</sub> oli ~0,4. 1,2 ml valmistatud suspensiooni kanti 2 ml tuubi ning lisati 200 µl n-heksadekaani (puhtuseaste 99%, Sigma-Aldrich). Tuub asetati vorteksile (Vortex-Genie2, Mo-Bio) ja lahust raputati täispöoretel (13000 rpm) 2 minutit. Vee ja orgaanilise solvendi kihtide lahutamiseks hoiti tuube 2 tundi laual ja seejärel mõõdeti vesifaasi neeldumine lainepikkusel 580 nm. Mõõdetud mikroobisuspensiooni absorptsiooni väärtuste põhjal arvutati mikroobirakkude suhteline hüdrofoobsus kasutades valemit:  $H\% = (1 - A_t/A_0) \times 100\%$ , milles A<sub>0</sub> tähistab mikroobisuspensiooni absorptsiooni lainepikkusel 580 nm enne n-heksadekaani lisamist ja A<sub>t</sub> vesifaasi absorptsiooni lainepikkusel 580 nm peale orgaanilise ühendi lisamist ja segamist vorteksil. Kõik analüüsid esindavad vähemalt kolme sõltumatut katset kolmes tehnilises korduses (Lisa 1).

Mikroseentega MATH testi ei õnnestunud hästi teha, sest OD mõõtmisel saadi märkimisväärselt erinevaid tulemusi, kuna seemed ei ole ühtlases suspensioonis. Test tehti nagu bakteritega, kuid kasvatati ainult 18h ning OD mõõtmine oli raskendatud. Tulemusi hinnati visuaalsel vaatlusel (Lisa 2).

### 2.2.4 Biofilmi moodustamine

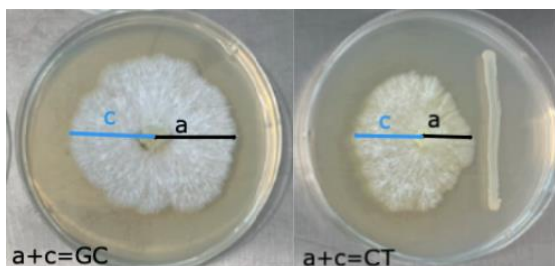
Biofilmi moodustumise määramiseks kasutati (Fletcher, 1977) meetodit, mõningate (Jakovleva et al., 2012) modifikatsioonidega.

Selleks kasutati mikrotiiterplaate (Greiner Bio-One International CELLSTAR 655180), mille igasse kaevukesse kanti 100 µl R2A söötmega rakke. Mikrotiiterplaadid pandi 30 °C kappi inkubeerima 24-ks, 48-ks ja 72-ks tunniks. Pärast vastava inkubatsiooniaja möödumist, lisati igasse

kaevukesse 25 µl 1% kristallvioleti vesilahust. Peale 15 minutit värvimist eemaldati värv ja pesti 2 korda 150 µl MilliQ veega kõiki kaevud üle. Seejärel lisati värvunud rakkudele 2 korda 180 µl 96% etanooli, mis tõsteti edasi puhtasse mikrotiiterplaati. Värvunud etanool lahjendati veega 1:2 (100 µl etanooli ja värvisegu, 200 µl MilliQ) Greiner Bio-One International CELLSTAR 655101 mikrotiiterplaadil ning mõõdeti neeldumist 540 nm lainepikkusel Magellan 6 programmiga. Biofilmi analüüsimiseks tehti 3 bioloogilist kordust, millest igaüks sisaldas 7 tehnilist kordust.

### 2.2.5 Vastandamiskatsed

Bakterite isolaate testiti antagonistliku toime suhtes mikroseente vastu, kasutades (Sakthivel ja Gnanamanickam, 1986) kirjeldatud meetodikat. Agaril olev seene tükki (~ 25 mm<sup>2</sup>) asetati R2A agariga tassi keskele. Bakterite isolaadist tehti joonkülv seene tükist ~ 2,5 cm kaugusele. Lisaks tehti kontrolltass, kus kasvas ainult seen. Tasse inkubeeriti 10 päeva temperatuuril 22 °C. Test tehti kolmes korduses. Inhibeerimise protsendi arvutamiseks kasutati Ebadzadsahrai et al. (2020) valemist:  $100 * [(GC-CT)/GC]$ , kus GC on seene kasv kontrolltassil ja CT on mikroseene kasv koos bakteriga (joonis 3). Inhibitsiooniprotsentide varieeruvust analüüsiti kasutades Kruskal-Wallis'e testi, et teha kindlaks kas inhibitsiooniprotsendid erinevad statistiliselt oluliselt katses kasutatud seente vahel ja/või sõltuvalt konkreetsest vastandamiskatses kasutatud bakterist. Kruskal-Wallis'e ja Wilcoxon'i teste kasutati, kuna Shapiro-Wilk testi põhjal polnud andmestik normaaljaotusega. Analüüsideks kasutati programmi R (vers. 4.2.0; R Core Team, 2022).



Joonis 3. Ebadzadsahrai et al. (2020) valemist:  $100 * [(GC-CT)/GC]$  tulenevad GC ja CT.

### 2.2.6 Preparaadid mikroskopeerimiseks

Preparaatide tegemiseks pandi kaks koos agariga söötmet välja lõigatud seene tükki (~ 25 mm<sup>2</sup>) 72 tunniks 22 °C juurde 100 ml R2A puljongisse (Neogen) kasvama. 72 tunni möödumisel lisati seene juurde 24 tundi 25 °C juures R2A puljongis kasvanud bakterid, mis eelnevalt fuugiti põhja

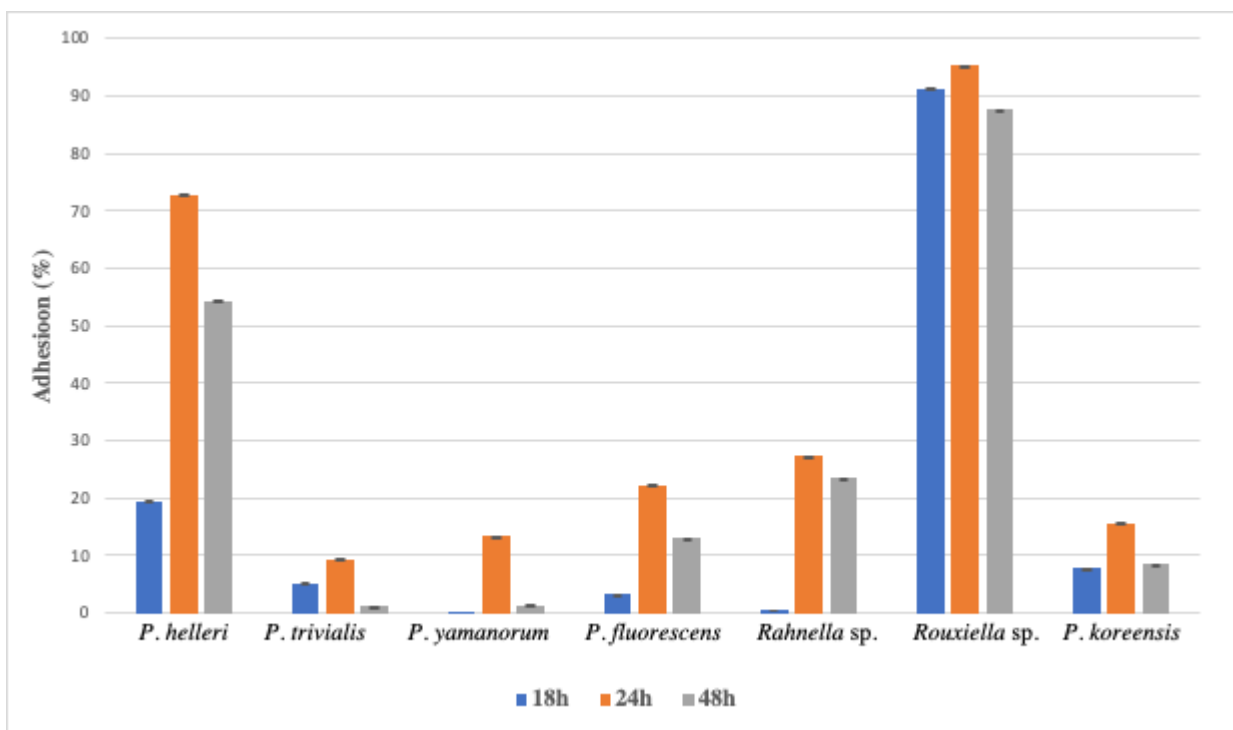
ja võeti üles 1xPBS-i puhvris (Naxo; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2). Lähtudes mõõdetud bakterisuspensiooni OD-st lisati seda seene juurde hulgal, et saavutada 100 ml-is puljongis algne bakterite optiline tihedus ( $A_{580\text{nm}}$ ) 0,06. 24 tunni möödudes võeti söötmest 10 µl külviaasaga seene niidistikku ja pesti 3x 800 µl-s 1xPBS-i puhvris. Pesemiste vahel segati lahust 30 sek vorteksil (Vortex-Genie 2; Scientific Industries), mille järel tsentrifugeeriti rakud põhja (2 min, 22 °C, 11 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424 R)). Viimaks suspendeeriti rakud üles 800 µl-s 1xPBS-is. Mikroskoobi alusklaasile lisati 35 µl destilleeritud vett ja 1 µl külviaasaga seene niidistikku. Peale pandi katteklase ja katteklase servad kaeti läbipaistva küünelakiga, et preparaat ära ei kuivaks. Mikroskopeerimiseks kasutati fluorestsentsmikroskoobe Olympus BX41 ja Olympus BX61 (ergastuse ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 480 ja 500 nm) ja faaskontrastmikroskoopi Olympus BX41, pilditöötlusel kasutati tarkvara Olympus CellSens.

## 2.3. TULEMUSED JA ARUTELU

### 2.3.1 MATH test

Looduskeskkonnas moodustavad paljud seened ja bakterid ühiseid kooslusi ja seene ning bakteri omavahelist interaktsiooni on hea uurida biofilmides, kus mõlemad mikroobid füüsiliselt suhtlevad. Adhesioon on oluline mikroobirakkude kinnitumisel teisele pinnale ja see on biofilmi moodustumise esimene samm. Mikroobirakkude kinnitumine pindadele sõltub paljudest teguritest, sealhulgas nt Browni liikumisest, van der Waalsi külgetõmbejõust, gravitatsioonijõududest ja pinna elektrostaatilistest laengutest. Üks olulisi tegureid on rakkude hüdrofoobsus (Van Loosdrecht et al., 1990).

Rakupinna suhtelise hüdrofoobsuse määramiseks kasutati MATH testi, mis põhineb mikroobirakkude jagunemisel süsivesiniku ja vesifaasi vahel (Lisa 1 ja Lisa 2). Selleks kasvatati uuritavaid bakterirakke R2A söötmes 18h, 24h ja 48h ning seenerakke 18h, seejärel tsentrifuugimisel eraldatud rakud pesti PUM puhvriga ning valmistati kindla optilise tihedusega suspensioon. Valmis suspensioonidele lisati n-heksadekaani ( $\log P=8,86$ ) ning raputati vorteksil. Pärast vorteksil raputamist lasti suspensioonidel seista vee ja orgaanilise solventi kihtide lahutamiseks. Süsivesinike tilkadele kleepunud mikroobirakud tõusevad õli/vee emulsioonile. Pärast 2 tundi seismist tekkinud vesifaasist võeti proov ja mõõdeti selle suspensiooni neelduvust. Saadud tulemuste põhjal arvutati uuritud tüvede rakupinna suhtelist hüdrofoobsust, kasutades peatükis 2.2.3. toodud valemit ning koostati joonisel 4 toodud diagrammid.



Joonis 4. Bakterite adhesiooni (%) heksadekaaniga.

Jooniselt 4 on näha, et rakupindade hüdrofoobsus on bakteritel erinev. Heksadekaaniga andsid tugeva suhtelise hüdrofoobsuse *Rouxiella sp.* (87-95%) ja *P. helleri* (19-72%), teised bakterid on pigem hüdrofiilse rakupinnaga (joonis 4). Kirjanduses on näidatud, et *Pseudomonas* perekonna erinevate liikide puhul on selle perekonna liikidel üldiselt rakupind hüdrofiilne, kuid toksiliste substraatide olemasolul on nad võimelised suurendama pinna hüdrofoobsust (Farrell ja Quilty, 2002). Samuti on viidatud, et bakterite rakupinna hüdrofoobsus varieerub liikide ja tüvede lõikes, isegi sama tüve piires, sõltudes kasvatusviisist ja kasvustaadiumist ning söötme koostisest (Elfazazi et al., 2021). Tulemustest selgus, et uuritavate bakterite suhteline hüdrofoobsus sõltus rakkude vanusest. Heksadekaanil saadi kõige madalamad väärtused 18h kasvanud rakkudel, kõige kõrgemad väärtused saadi 24h vanustel rakkudel (joonis 4). Mirani et al. (2018) näitasid samuti oma uurimistöös, et vanematel rakkudel muutub rakupind raku vananedes hüdrofoobsemaks.

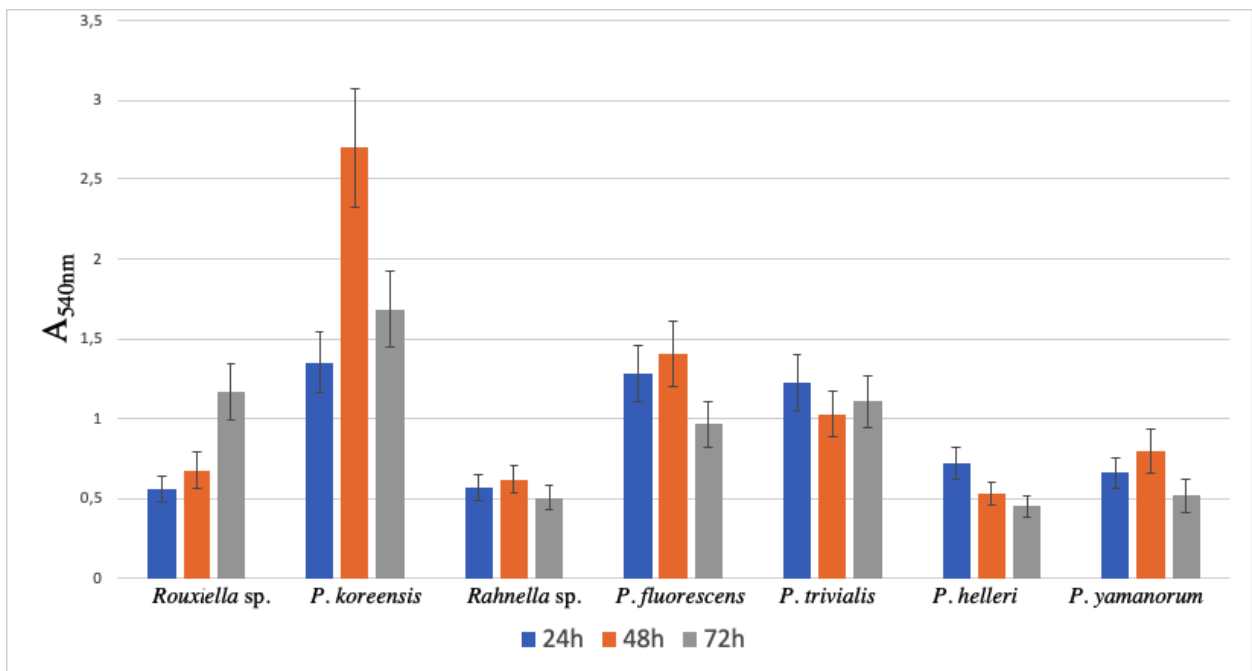
Antud MATH testi tehti ka uuritavate seentega, kuid kahjuks on seente suspensioon väga helbeline ja tükiline ning oli võimatu ühtset optilist tihedust mõõta ühtse suspensiooni saamiseks. Ka kirjanduses on mainitud, et filamentsete seentega on väga raske MATH testi teha (Smits et al., 2003). Lisades rakususpensioonidele n-heksadekaani ja vaadates vesifaasi visuaalselt (Lisa 2) võib

järeldada, et seente rakupind võiks olla hüdrofoobne, kuna vesifaasis polnud seente helbeid näha ning vesifaas oli hästi selge ja läbipaistev. On täheldatud, et kõrge toitainetesisaldusega söötmes kasvanud seenekultuurid moodustavad rohkem hüdrofoobseid koniide ja madala toitainetesisaldusega söötmes pigem hüdrofiilseid koniide (Holder et al., 2007), samas võib koniidide vananedes hüdrofoobsus muutuda (Amiri et al., 2005). Kuna selles töös kasvatati uuritavaid seeni kõrge toitainetesisaldusega söötmel R2A 18h, võib eeldada, et antud katse andis hüdrofoobse tulemuse. Smits et al. (2003) järeldasid oma katsete põhjal, et askomütseetide rakupind on hüdrofoobne, mis langeb samuti kokku meie visuaalsete tulemustega, kuna kolm uuritavat seent kuuluvad samuti askomütseetide hulka. Kuna kirjanduses on pakutud, et bakterirakud seonduvad üldiselt sarnase hüdrofoobsusega rakkudega (van der Mei et al., 1991) ehk siis hüdrofoobsema rakupinnaga rakud eelistavad hüdrofoobsemat keskkonda (Giaouris et al., 2009; Krasowska ja Sigler, 2014) võiks eeldada hüdrofoobsete bakterirakkude seondumist hüdrofoobsete seentega.

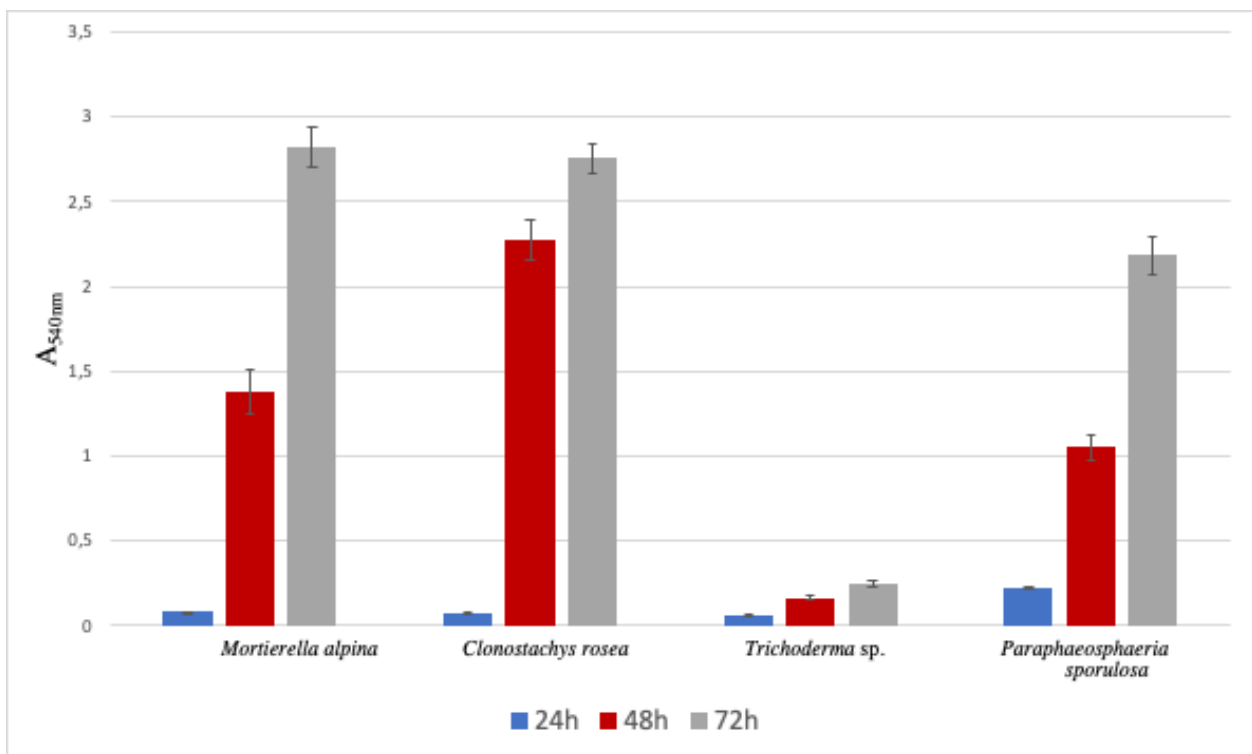
### **2.3.2 Bakterite ja mikroseente biofilmi moodustamine**

Bakterite võime moodustada biofilmi võib soodustada bakterite edukat seondumist seentega. Seetõttu oli antud uurimistöös oluline kindlaks teha, kas uuritavad mikroorganismid on võimelised moodustama biofilmi ning kuidas mõjutab see bakterite kinnitumist.

Biofilmi moodustumist mõõdeti pärast vastavat inkubatsiooniaega mikrotiiterplaatide seintele kinnitunud rakkudest välja pestud kristallvioleti lahuse neeldumist 540 nm juures ( $A_{540 \text{ nm}}$ ). Tulemused on toodud joonistel 5 ja 6.



Joonis 5. Bakterite biofilmi moodustumine mikrotiiterplaatidel R2A söötmel pärast 24-, 48- ja 72-tunnist inkubeerimist. Veapiirid näitavad kolme sõltumatu bioloogilise katse standardhälvet (igal 7 tehnilist kordust).



Joonis 6. Seente biofilmi moodustumine mikrotiiterplaatidel R2A söötmel pärast 24-, 48- ja 72-tunnist inkubeerimist. Veapiirid näitavad kolme sõltumatu bioloogilise katse standardhälvet (igal 7 tehnilist kordust).

Jooniselt 5 selgub, et bakterite võime moodustada biofilmi on erinev ja mõnel bakteril sõltus biofilmi hulk suuresti inkubeerimise ajast. Kõige rohkem moodustas biofilmi *P. koreensis*. Ka varasemas uuringus täheldati *P. koreensis*'e biofilmi moodustamise märkimisväärset tulemust, eriti peale 24 tundi (Rossi et al., 2018). Kuna töös kasutatud mikrotiiterplaadi pind on pigem hüdrofiilsem, läheb biofilmi moodustamise tulemus kokku ka MATH testiga. Heksadekaaniga MATH testis andis *P. koreensis* hüdrofiilse tulemuse.

Uuritud bakteritest moodustasid biofilmi mõõdukalt *P. fluorescens* ja *P. trivialis*. *P. fluorescens*'i mõõdukat biofilmi moodustamist täheldati ka Liu et al. (2013) uuringus. Rossi et al. (2018) uurimuses leiti, et *P. fluorescens*'i erinevad tüved moodustasid biofilmi erinevalt ja lisaks oli ühe tüve biofilmi moodustamise võimekus 10 °C juures kõrgem kui 30 °C juures. Kuna antud uurimistöös kasvatati baktereid 30 °C juures, võib oletada, et madalamal temperatuuril kasvatates võiks *P. fluorescens*'i biofilmi moodustamise võimekus tõusta.

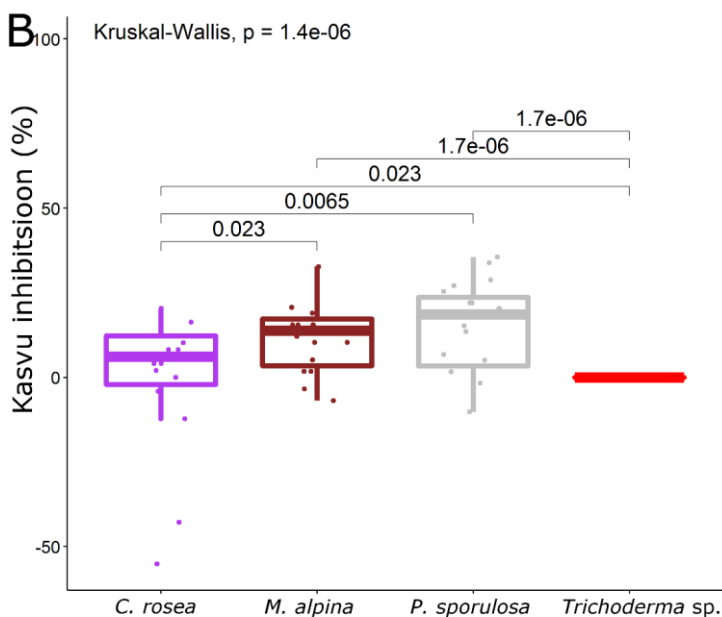
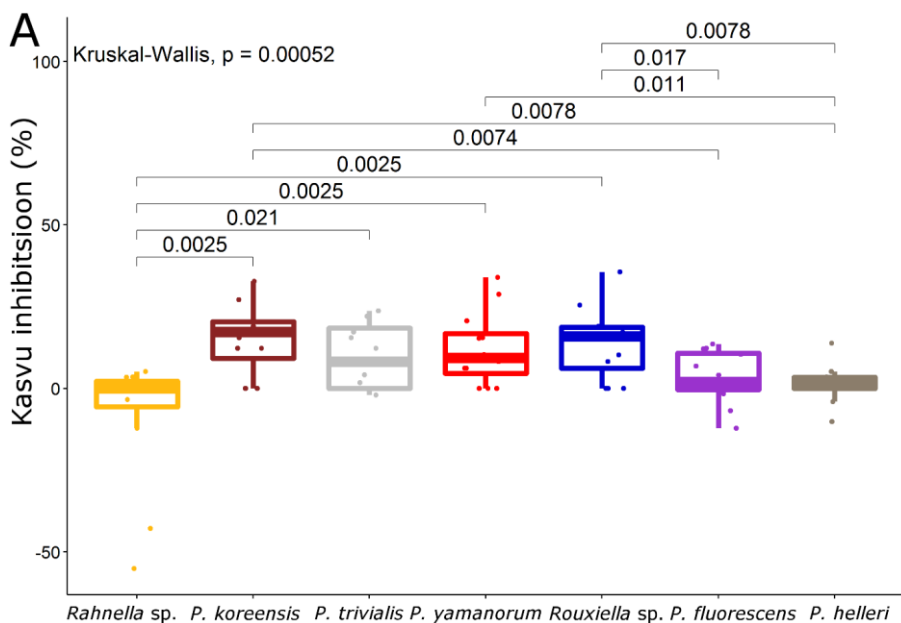
*Rahnella* sp., *P. yamanorum* ja *P. helleri* moodustasid antud bakteritest biofilmi kõige vähem. Do et al. (2020) uuringus saadi sama tulemus *Rahnella* sp. kohta, kus biofilmi moodustamine suurenes kuni 48 tunnini ning hakkas siis langema. *Rouxiella* sp. biofilmi moodustamise võimekus kasvas ajas, olles kõige kõrgem 72 tunni möödumisel ( $A_{540nm}=1,17$ ). Teistel bakteritel hakkas peale 48 tundi biofilmi moodustamise võimekus üldjuhul langema, ainult *P. trivialis*'el tõusis see 72 tunni möödumisel ( $A_{540nm}=1,1$ ), kuid mitte nii märkimisväärselt võrreldes teiste ajapunktidega kui *Rouxiella* sp.-l.

Analüüsid MATH testi tulemusi biofilmi moodustamise võimekusega, võib väga üldiselt järeldada, et hüdrofiilsema rakupinnaga bakterid moodustasid töös kasutatud mikrotiiterplaadil rohkem biofilmi kui hüdrofoobsema rakupinnaga bakterid. Samas ei kehti see kõikide bakterite puhul. Kuigi üldreegel on, et adhesioon suureneb koos hüdrofoobsuse suurenemisega ja väheneb hüdrofoobsuse vähenemisega, on mitmed uuringud näidanud vastuolulisi tulemusi, kus bakteritel pole leitud seost raku pinna hüdrofoobsusel ja kinnitumisel kas hüdrofiilse või hüdrofoobse substraadiga (Basson et al., 2008).

Joonisel 6 toodud mikroseente biofilmi moodustamise andmetest on näha, et mikroseente puhul moodustus biofilmi rohkem kui bakteritel (joonis 5). Tulemustest selgub, et kõigi mikroseente biofilmi moodustamine oli minimaalne 24h möödumisel, kuid tõusis peale seda märkimisväärselt. See võib tuleneda sellest, et kõigepealt kinnituvad mikroseente koniidid substraadile ja alles siis hakkavad moodustama hüüfe ja hüüfid saavad hakata kinnituma substraadile ning biomass suureneb (vt. 1.2.2). Kui kiiresti mikroseen biofilmi moodustab sõltub ka söötmest, millel seent kasvatatakse. Siqueira ja Lima (2013) näitasid oma uurimistöös, et maltoosi sisaldaval söötmel moodustasid filamentsed seened kiiremini biofilmi kui R2A söötmel, R2A söötmel kasvades kulus 24h filamentide moodustamiseks. Ka selles uurimistöös kasutati biofilmi katses R2A söödet. Lisaks võib koniidide hüdrofoobsus mõjutada koniidide adhesiooni substraadile ja sellest tulenevalt mõjutatada biofilmi moodustumist (Siqueira ja Lima, 2013). Antud uurimistöös MATH testi visuaalsel hindamisel (Lisa 2) oletati, et uuritavate seente rakupind on hüdrofoobne 18h kasvanud kultuuridel. Mikroseentest moodustasid kõige rohkem biofilmi *M. alpina* ja *C. rosea*. *P. sporulosa* biofilmi moodustamise võimekus tõusis tähelepanuväärselt 72 tunni möödumisel. Erandiks oli vaid *Trichoderma* sp., mille biofilmi moodustamise võimekus oli väga väike võrreldes teiste seentega läbi kõikide ajapunktide. Ichikawa et al. (2017) näitasid oma uurimistöös, et väga tugeva hüdrofoobse rakupinnaga seened moodustasid kõige vähem biofilmi. Sellest tulenevalt võib oletada, et äkki on *Trichoderma* sp. rakupind väga tugevalt hüdrofoobne ja seetõttu ei moodusta biofilmi, samas ei ole alati kirjanduses leitud ühest seost hüdrofoobsuse astme ja pinnale kleepunud rakkude arvu vahel.

### 2.3.3 Vastandamiskatsed

Bakteri seondumine seene hüüfile sõltub nendevahelisest sobivusest ja teineteise olemasolu tajumisest, kas positiivse või negatiivsena. Negatiivse interaktsiooni puhul võib tegemist olla näiteks mükofaagiaga, kus bakterid seene lõpuks hävitavad (Bodé et al., 2013; Rudnick et al., 2015). Positiivse interaktsiooni puhul võivad saada mõlemad osapooled teineteise olemasolust kasu, näiteks kaitsevad patogeene eest või varustavad vajalike ühenditega (Kobayashi ja Crouch, 2009). Selleks, et välja selgitada kuidas antud uurimistöös seen bakteri olemasolule reageerib ja kas biofilmi moodustumine seene hüüfide pinnale on seotud pigem bakteri antagonistliku või mitteantagonistliku mõjuga seene kasvule, viidi läbi vastandamiskatsed kõikide seen-bakter kombinatsioonidega. Tulemused on toodud joonisel 7 ja Lisa 4.



Joonis 7. Seene kasvu inhibitsioon R2A söötmel sõltuvalt bakterist, millega seent koos kasvatati (A) ja võrdlusena katses kasutatud seente vahel (B). Inhibitsiooniprotsente on võrreldud Kruskal-Wallis’e testi kasutades ja paarikaupa võrdlusteks on kasutatud Wilcoxonitesti. Joonisel on märgitud ainult statistiliselt olulised p-väärtused ( $p < 0.05$ ).

Vastandamiskatsete üldised tulemused näitasid, et erinevad bakterid mõjutasid seente kasvu statistiliselt oluliselt erinevalt (Kruskal-Wallise test,  $p < 0.001$ ; joonis 7A) ja samas reagerisid ka erinevad seened bakterite juuresolekul erinevalt ( $p < 0.001$ ; joonis 7B). Vaadates kõiki uuritavaid

seeni eraldi, on näha, et iga seene puhul erinevate bakteritüvede mõju varieerub statistiliselt oluliselt ( $p < 0.001$ ). Samas on tulemustest näha, et kolme seeneliigi (*C. rosea*, *M. alpina*, *P. sporulosa*) puhul võib leida sarnasusi nende reageerimisel teatud bakteritele, näiteks inhibeerivad nende kasvu kõige vähem või lausa soodustavad bakterid *Rahnella* sp., *P. helleri* ja teatud määral *P. fluorescens* (joonis 7A). Samal ajal aga avaldavad kõige tugevamat inhibeerivat mõju kõigi kolme seene kasvule bakterid *P. koreensis*, *Rouxiella* sp. ja *P. yamanorum* (joonis 7A). Erandiks on seen *Trichoderma* sp., mille kasvule ükski bakter ei avaldanud ei negatiivset ega positiivset mõju (joonis 7B). Võrreldes ühe ja sama bakteritüve mõju erinevate seente kasvule selgus, et kõikide bakterite, välja arvatud *P. koreensis*'e, *P. helleri* ja *P. fluorescens*'i mõju varieerub statistiliselt oluliselt ( $p < 0.05$ ) seenetaksonite vahel. Selle põhjal võib öelda, et nende kolme eelmainitud bakteri mõju on antud katsesse kaasatud seente kasvu suhtes sarnane, kas pigem soodustades või pigem takistades ühtmoodi uuritavate seente kasvu.

Käesolev töö näitas, et enamik baktereid inhibeerisid katses kasutatud mikroseente kasvu. Sarnaselt antud töö tulemustele on ka varem leitud, et paljud mullas ja risosfääris levinud bakterid võivad käituda mulla mikroseente, sealhulgas perekonna *Trichoderma* sp. ja *Mortierella* sp., suhtes antagonistlikult, kinnitades nende hüüfidele ja kasutades neid toiduks (Rudnick et al., 2015). Erinevalt eelmainitud uuringust ei tuvastatud käesolevas töös seene *Trichoderma* sp. kasvu inhibeerimist bakterite poolt, küll aga inhibeerisid ka selles töös enamik uuritud bakteritüvedest seene *M. alpina* kasvu. *Trichoderma* perekonna liigid on kiire kasvuga agressiivsed konkurendid (Tyśkiewicz et al., 2022) ja ilmselt seetõttu ei inhibeerid ka selles uuringus kasutatud bakterid tema kasvu. Varasemalt on tuvastatud, et näiteks liik *Trichoderma viride* omab tugevamat biokontrolli efekti koos bakteriga *P. fluorescens* kui kumbki organism üksi (Rajeswari, 2019), mis viitab kaudselt sellele, et bakter tõenäoliselt seene kasvu alla ei suru, vaid nad suudavad edukalt koos eksisteerida. Sarnaselt eelmainitud tulemustele leiti ka käesolevas töös, et *Trichoderma* sp. kasv ei ole inhibeeritud uuritud bakterite poolt, millest enamik kuulusid samuti perekonda *Pseudomonas*. Lisaks saab seene *Trichoderma* sp. puhul välja tuua huvitava tulemuse, kus enamik baktereid soodustas seene koniidide moodustumist, näiteks koos bakteriga *P. trivialis* oli koniidide teke intensiivsem kui negatiivse kontrolli puhul (Lisa 3A). Samas aga kasvades koos bakteriga *Rahnella* sp. koniide nii palju ei moodustunud (Lisa 3A). Koniidide teket mõjutavad erinevad keskkonnafaktorid, nagu valgus ja toitainete hulk substraadis, aga laiemalt seostatakse koniidide teket stressitingimustega, sest konidisatsioon on seenele vajalik mehhanism, et ebasoodsates

tingimustes levida ja ellu jääda (Carreras-Villaseñor et al., 2012), seega võib oletada, et bakterid, mis soodustasid koniidide teket, avaldasid seenele siiski suuremat negatiivset mõju, kui bakter, millega koos kasvades *Trichoderma* sp. koniide ei moodusta. Seega võib öelda, et *Rahnella* sp. pigem soodustab *Trichoderma* sp. Lisaks soodustab *Rahnella* sp. ka *C. rosea* kasvu, ei avalda negatiivset mõju ka seenel *M. alpina* kasvule ning inhibeeriv mõju seenel *P. sporulosa* kasvule on samuti minimaalne. *Rahnella* sp. mitteantagonistlik ja pigem positiivne mõju seente kasvule võib olla seotud sellega, et see ei moodusta nii hästi biofilmi kui mitmed teised bakterid või ei kinnitu üldse seente hüüfidele, nagu näiteks *M. alpina* puhul ega takista seega kuidagi seenel kasvu. Samas ei saa väita, et *Rahnella* sp. ja seente vahel oleks täiesti neutraalne suhe ja nad üldse teineteist ei mõjuta, sest nagu tulemused näitasid, siis mingil viisil antud bakter soodustab *C. rosea* ja *Trichoderma* sp. kasvu. Varasemalt on leitud, et *Rahnella* sp. soodustab seenel *Armillaria gallica* kasvu, tootes kasvuhormooni indool-3-atseethape (IAA; Liu et al., 2022). IAA tootmine võib olulist rolli mängida ka *C. rosea* ja *Trichoderma* sp. kasvu soodustamisel, seda enam, et käesolevas töös kasutatud *Rahnella* sp. tüve puhul on IAA tootmise võime varasemalt tuvastatud (avaldamata käsikiri).

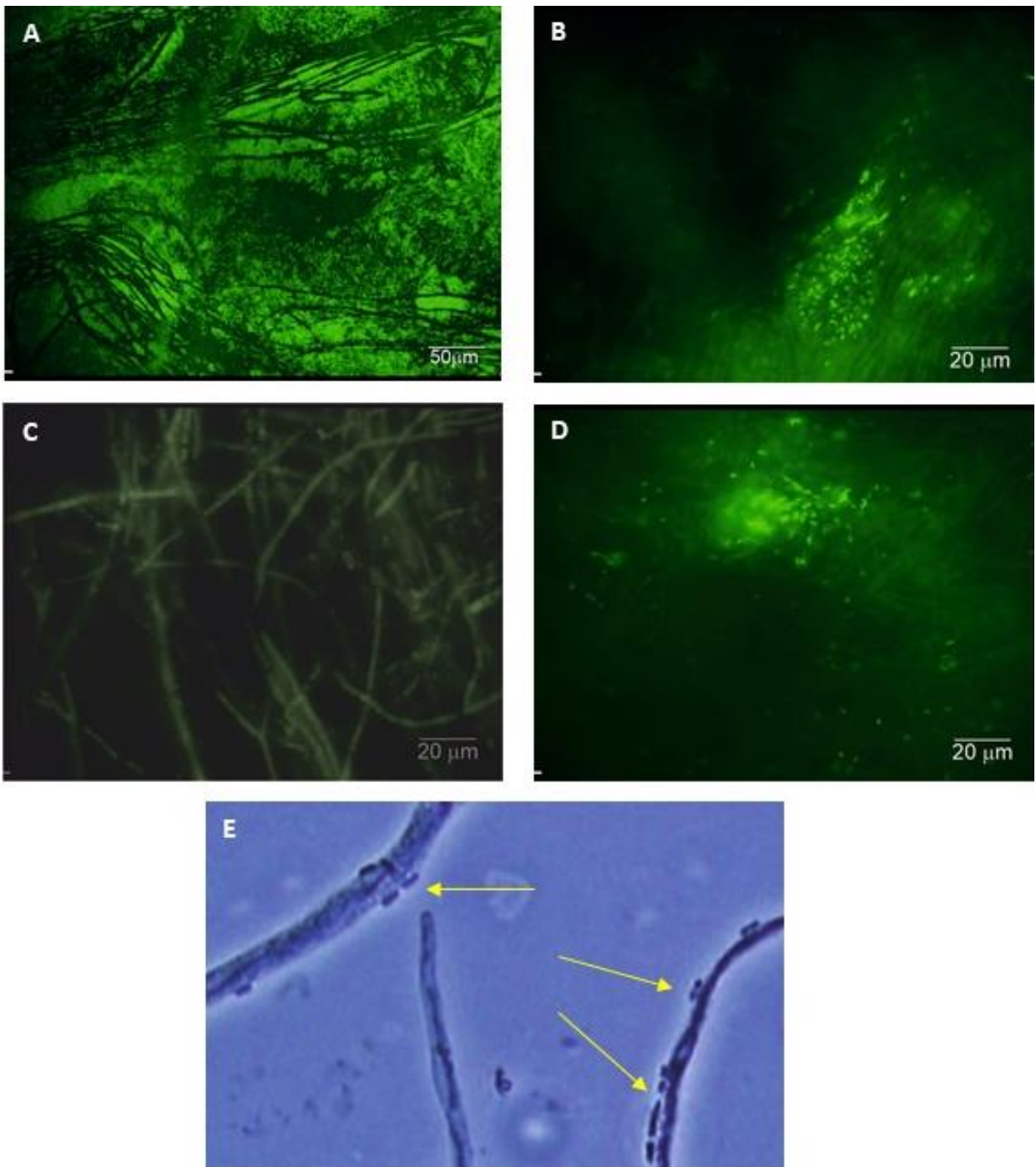
Ka bakter *P. helleri* mõjutab seente *P. sporulosa* ja *C. rosea* kasvu positiivselt, *Trichoderma* sp. kasvule mõju ei avalda ja taaskord on tegemist bakteriga, mille biofilmi moodustamise võime on nõrk ning ilmselt seetõttu ei esine ka seenel kasvu inhibeerimist. Seega viitavad käesoleva töö tulemused asjaolule, et mida parem biofilmi moodustaja bakter on, seda rohkem inhibeerib ta seente kasvu – sellised bakterid on näiteks *P. koreensis* ja *P. trivialis*. Varasemates töödes on samuti leitud, et biofilmi moodustavad bakterid võivad inhibeerida seenel biofilmi moodustamist või muud moodi seenel kahjulikud olla ning lõpuks seenel isegi tappa (Mowat et al., 2010; Tal et al., 2016). Seened toodavad küll sageli teatud antibakteriaalseid ühendeid bakterite vastu, aga biofilmi moodustavad bakterid on nende suhtes tõenäoliselt resistentsemad, avaldades seenel kasvule seetõttu tugevat negatiivset mõju (Afonso et al., 2019; Chen et al., 2022). Bakter ja seen ei pruugi tassil veel isegi füüsiliselt kokku puutuda, kui seen võib juba ära tunda bakteri poolt vabastatud teatud ühendid, võimalik ka, et antud juhul just näiteks bakteriaalse biofilmi tekkega seotud ühendid, ja vastavalt sellele reageerida, pärssides näiteks hüüfidel kasvu selles suunas. Kokkuvõttes võib öelda, et bakterite mõju seente kasvule sõltub nii konkreetsest seenest kui konkreetsest bakterist, kuid on ka baktereid, kes võivad erinevate seente kasvu sarnaselt mõjutada, nagu eelpool kirjeldatud.

### 2.3.4 Bakterite kinnitumine mikrosete niidistikule

Uurides eelnevalt mikroobide rakupinna hüdrofoobsust, bakterite inhibeerivat mõju seentele ja biofilmi moodustamise võimekust, uuriti viimaks bakterite võimet interakteeruda seente hüüfidega mikrokoobis. Selleks kasvatati igat mikroset ja GFP-ga märgistatud bakterit koos 24 tundi R2A-söötmel, seejärel pesti niidistikku 3 korda 1xPBS puhvriga ning valmistati mikrokoobi alusklaasile preparaadid. Preparaate vaadati nii fluorestsentsmikrokoobiga kui ka faaskontrastmikrokoobiga. Tulemused on toodud tabelis 3 ja joonisel 8 on toodud näidispildid interaktsiooni tulemustest.

Tabel 3. Bakterite kinnitumine mikrosete niidistikule mikrokoobist vaadatuna.

	<i>Mortierella alpina</i> A10	<i>Clonostachys rosea</i> A18	<i>Trichoderma</i> sp. A34	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> A42
<i>P. trivialis</i> (MP140)	+	+	+	+
<i>P. yamanorum</i> (MP170)	+	+	+	-
<i>P. helleri</i> (MP233)	+	+	-	+
<i>Rouxiella</i> sp. (41)	+	+	+	+
<i>Rahnella</i> sp. (MP245)	-	+	+	+
<i>P. koreensis</i> (255)	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> (MP244)	+	+	+	+



Joonis 8. Fluorestsentsmikroskoobiga Olympus BX61 tehtud pildid (ergastuse ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 480 ja 500 nm), pilditöötlusel kasutati tarkvara Olympus CellSens, A - 400x suurendus; B-D - 1000x suurendus. Bakteriks on kõikidel piltidel GFP-ga märgistatud *P. helleri*. A - seen *Mortierella alpina* (positiivne interaktsioon); B - seen *Clonostachys rosea* (positiivne interaktsioon); C - seen *Trichoderma* sp. (negatiivne interaktsioon); D seen *Paraphaeosphaeria sporulosa* (positiivne interaktsioon); E - faaskontrastmikroskoobiga Olympus BX41 1000x suurendusega tehtud pilt *Mortierella alpina* ja *P. helleri*, kollaste nooltega on näidatud bakterite seondumine seene hüüfile (suurendatud pilt).

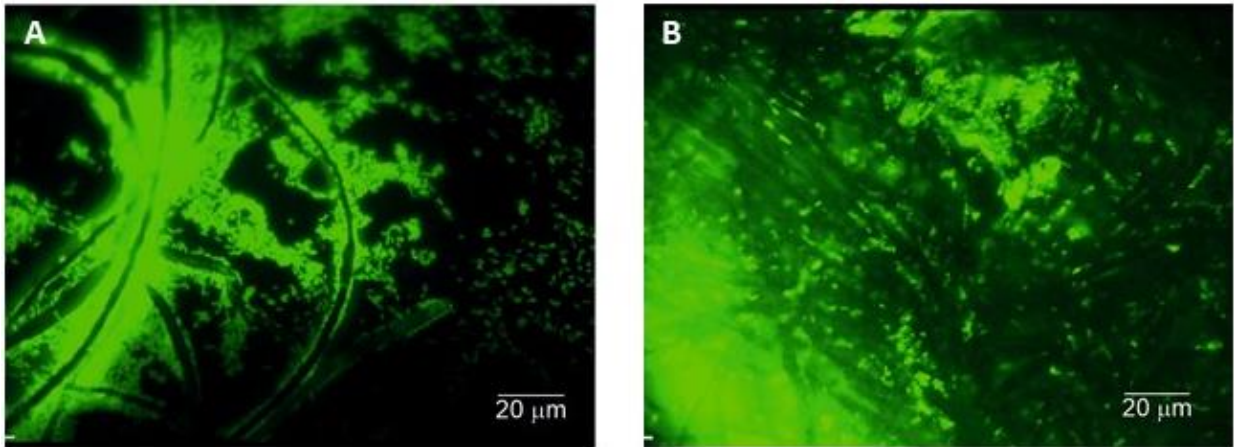
Vaadeldud preparaatidest selgus, et *C. rosea* oli ainus seen, mille hüüfidele kinnitusid kõik bakterid. Lisaks moodustas *C. rosea* kõige rohkem biofilmi (joonis 6). Inhibitsioonikatsetest selgus, et *C. rosea* kasvu inhibeerisid *P. koreensis* ja *Rouxiella* sp. ainsana üle 10% (vastavalt 14,4% ja 11%; Lisa 4), kuid see ei takistanud bakteri rakkude kleepumist seene hüüfile. Stanley et al. (2014) näitasid samuti oma uurimistöös, et kuigi *Bacillus subtilis* inhibeeris seene kasvu tassil, kinnitus bakter hüüfidele väga hästi. Teised uuritavad bakterid kas inhibeerisid vähe või hoopiski soodustasid *C. rosea* kasvu – *Rahnella* sp (37,7%) ja *P. helleri* (1,4%) (Lisa 3 B, Lisa 4).

*M. alpina* hüüfidele kinnitusid kõik bakterid peale *Rahnella* sp., samuti *Trichoderma* sp. hüüfidele kinnitusid kõik bakterid välja arvatud *P. helleri*, mis oli ühtlasi vähem biofilmi moodustav bakter (joonis 5). Samas, kuigi *P. helleri* ei ole hea biofilmi moodustaja, kinnitub ta siiski *C. rosea*, *M. alpina* ja *P. sporulosa* hüüfidele. MATH test näitas, et *P. helleri* rakupind oli kõige hüdrofoobsem võrreldes teiste pseudomonaadidega ning võiks eeldada, et see bakter seondub hästi hüdrofoobsete seentega kuid seda ei nähtud preparaadil. Kirjanduses on näidatud, et mullabakterite ja seente vahelised koostoimed võivad olla spetsiifilised ja teatud bakteritüved võivad kinnituda mõne seeneliigi hüüfidele, kuid mitte teistele (Toljander et al., 2006).

Triveni et al. (2012) uuringus näidati, et *Trichoderma viride* niidistikule kinnitus *P. fluorescens*, mis ühtib antud uurimistööga, kuigi selles töös pole *Trichoderma* liik täpselt teada. Varasemalt on leitud, et *Trichoderma viride* ja *P. fluorescens* on võimelised koos biofilmi moodustama ja nende moodustatud biofilm mõjutas puuvillataimede kasvu märkimisväärselt, võrreldes kontrolltaimedega (Triveni et al., 2012; 2015). Käesolevas uurimistöös kinnitusid samuti kolme *Pseudomonas* liigi rakud *Trichoderma* hüüfidele (Tabel 3). Vastandamiskatsetest selgus (Joonis 7, Lisa 3 D, Lisa 4), et *P. sporulosa* oli mikroseen, mille kasvu inhibeerisid bakterid üldjoontes kõige rohkem ja selle seene hüüfidele kinnitus ka kõige vähem bakteri liike.

Kõikidest uuritud bakterite ja seente preparaatidest pandi tähele, et *P. trivialis* ja *P. fluorescens* moodustasid väga rohkelt biofilmi kõikidel seente hüüfidel võrreldes teiste bakteritega (joonis 9). Ka kirjanduses on näidatud, et *Pseudomonas*'e liigid kinnituvad seente hüüfidele ja moodustavad üldjuhul rohkem biofilmi kui teiste bakterite perekondade esindajad (Toljander et al., 2006). Lisaks eelnimetatud kahele *Pseudomonas* perekonna liigile ka *Rouxiella* sp. seondus kõikide seente

hüüfidega. *Rouxiella* sp. oli ainus bakter, mille rakupind oli kõige hüdrofoobsem ja ta seostus hüdrofoobsete seentega, mis ühtib osade tulemustega kirjandusest (Di Ciccio et al., 2015).



Joonis 9. Fluorestsentsmikroskoobiga Olympus BX61 tehtud pildid (ergastuse ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 480 ja 500 nm), pilditöötlusel kasutati tarkvara Olympus CellSens, 1000x suurendus. A - seen *Paraphaeosphaeria sporulosa* ja bakter *P. fluorescens*; B - seen *Paraphaeosphaeria sporulosa* ja bakter *P. trivialis*.

Käesolev töö näitab, et kandseente viljakehadest isoleeritud bakterid on võimelised interakteeruma teistesse hõimkondadesse (Ascomycota, Mortierellomycota) kuuluvate mikroseente hüüfidega. Samas bakteri kinnitumine seene hüüfile võib olla spetsiifiline, mõned bakteritüved kinnituvad mõne seeneliigi hüüfidele, kuid mitte teistele. Antud uurimistöö on uudne, kuna seesuguseid uuringuid on seni väga vähe tehtud.

## KOKKUVÕTE

Töös uuriti seitsme varasemalt makroseente viljakehadest isoleeritud ja potentsiaalselt taimede kasvu soodustava bakteri kinnitumist mullas laialt levinud 4 mikroseeene niidistikule biofilmi moodustumise näitel. Täpsemalt sooviti välja selgitada kui spetsiifiline on mikroseen-bakter seondumine ja millist rolli mängib seondumisel seente ja bakterite võime moodustada biofilmi, nende rakupinna hüdrofoobsus ning bakterite antagonistlik või mitteantagonistlik mõju seene kasvule.

Töös saadud tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

- töös kasutatud bakteritest olid hüdrofoobse rakupinnaga ainult *Pseudomonas helleri* ja *Rouxiella* sp., teised bakterid olid hüdrofiilsed ning mikroseeened eeldatavalt kõik hüdrofoobsed;
- bakteritest moodustas biofilmi kõige paremini *Pseudomonas koreensis*, teised bakterid moodustasid kas mõõdukalt või vähe. Mikroseeentest moodustasid biofilmi kõige paremini *Mortierella alpina* ja *Clonostachys rosea*. *Paraphaeosphaeria sporulosa* moodustas biofilmi hästi 72 h möödumisel ja *Trichoderma* sp. ei olnud hea biofilmi moodustaja;
- *Clonostachys rosea*, *Mortierella alpina* ja *Paraphaeosphaeria sporulosa* kasvu inhibeerivad kõige vähem või lausa soodustavad bakterid *Rahnella* sp. ja *Pseudomonas helleri*, mis samas moodustasid biofilmi vähem. Samal ajal avaldavad kõige tugevamat inhibeerivat mõju kõigi kolme seene kasvule bakterid *Pseudomonas koreensis* ja *Rouxiella* sp., mis moodustasid biofilmi rohkem;
- võib öelda, et seente kasvu inhibeerisid biofilmi rohkem moodustavad bakterid;
- *Trichoderma* sp. kasvule ei avaldanud ükski bakter ei negatiivset ega positiivset mõju, samas põhjustas *Rahnella* sp. erinevalt teistest bakteritest *Trichoderma* sp. puhul tunduvalt nõrgemat konidisatsiooni, mis on üldiselt iseloomulik reaktsioon stressitingimustele, olles seega pigem seene kasvu soodustav bakter;
- bakterite kinnitumine seente hüüfidele sõltub nii konkreetsest seenest kui ka konkreetsest bakterist.

Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal võib väita, et bioväetiste seisukohalt võiks olla *Trichoderma* sp. üks parimaid lahendusi, kuna enamik baktereid kinnituvad tema hüüfidele ja ei inhibeeri tema kasvu. Lisaks võiks potentsiaali olla seenel *Clonostachys rosea*, kuna kõik bakterid seonduvad ja *P. helleri* ja *Rahnella* sp. isegi soodustasid selle mikrooseene kasvu. Bakteritest oleks sobivaim *Rahnella* sp., sest nagu eestpoolt lugeda võib, ei inhibeeri see bakter oluliselt seente kasvu ja tõenäoliselt toodab kasvuhormooni IAA, mis on samal ajal taimede kasvuhormooniks. Bakteritest võiks veel sobilik olla *Pseudomonas fluorescens*, mis ei inhibeerinud samuti märkimisväärselt seente kasvu, kinnitus kõigile ja on ka varasemalt leitud, et koos seenega moodustab rohkem biofilmi ning *P. fluorescens*'i ja seene biofilm võib mõjuda hästi taimede kasvule.

## Bacterial attachment to the mycelium of microfungi on the example of biofilm

Helery Hindriksoo

### Summary

Biofilms of bacteria and microfungi are found in various environments, and their study is important for several fields, including medicine and agriculture. Biofilms are used in agriculture both for combating plant pathogens and promoting plant growth, thereby increasing agricultural productivity. This research focuses on studying the interactions between bacteria and microfungi potentially used for promoting plant growth and combating plant pathogens, and the knowledge gained from this work is widely important, especially for the future development of biofertilizers based on microfungi-bacteria complexes. In this study, seven bacteria isolated from fungal fruiting bodies and four fungi isolated from agricultural soil were used.

To better understand the interactions between bacteria and fungi and the attachment of bacteria to fungal hyphae, the ability of bacteria and fungi to form biofilms, cell hydrophobicity/hydrophilicity, and possible antagonistic/non-antagonistic relationships between them were tested. The microfungi used in the study were expected to have hydrophobic cell surfaces, while the bacterial cell surfaces were mostly hydrophilic. Among the bacteria, *Pseudomonas koreensis* was the best biofilm former, while all microfungi except *Trichoderma* sp. were good at forming biofilms. *Clonostachys rosea*, *Mortierella alpina*, and *Paraphaeosphaeria sporulosa* are least inhibited or even promoted by bacteria *Rahnella* sp. and *Pseudomonas helleri*, which, however, formed less biofilm. Meanwhile, bacteria *Pseudomonas koreensis* and *Rouxiella* sp., which formed more biofilm, exerted the strongest inhibitory effect on the growth of all three fungi. None of the bacteria inhibited the growth of *Trichoderma* sp.

It can be concluded that the bacteria that successfully formed biofilms inhibited the growth of microfungi the most. The attachment of bacteria to fungal hyphae depends on both the specific fungus and the specific bacterium.

Based on the results obtained in this study, it can be concluded that *Trichoderma* sp. could be one of the best choices among the fungi for biofertilizers, as most bacteria attached to its hyphae without inhibiting its growth. Additionally, there may be potential in the fungus *Clonostachys rosea*, as all

bacteria interacted with its hyphae, and *Pseudomonas helleri* and *Rahnella* sp. even promoted its growth. Among the bacteria, *Rahnella* sp. would be the most suitable choice since it did not significantly inhibit fungal growth and likely produces the growth hormone IAA, which is also a plant growth hormone. Another suitable bacterium could be *Pseudomonas fluorescens*, which did not significantly inhibit fungal growth, attached to all fungi, and previous studies have shown that a biofilm formed by *P. fluorescens* in conjunction with a fungus can positively affect plant growth.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Abeyasinghe, G., Kuchira, M., Kudo, G., ... Takeshita, N. (2020). Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism. *Life Science Alliance*, 3(12), e202000878.
- Afonso, T. B., Simões, L. C. and Lima, N. (2019). In vitro assessment of inter-kingdom biofilm formation by bacteria and filamentous fungi isolated from a drinking water distribution system. *Biofouling*, 35(10):1041-1054.
- Amiri, A., Cholodowski, D. and Bompeix, G. (2005). Adhesion and germination of waterborne and airborne conidia of *Penicillium expansum* to apple and inert surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(1), 40–48.
- Ammar, Y., Swailes, D., Bridgens, B. and Chen, J. (2015). Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. *Surface and Coatings Technology*, 284, 410–416.
- Andryukov, B., Romashko, R., Efimov, T., Lyapun, I., Bynina, M. and Matosova, E. (2020). Mechanisms of Adhesive–Cohesive Interaction of Bacteria in the Formation of Biofilm. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 35(4), 195–201.
- Artyushkova, K., Cornejo, J. A., Ista, L. K., Babanova, S., Santoro, C., Atanassov, P. and Schuler, A. J. (2015). Relationship between surface chemistry, biofilm structure, and electron transfer in *Shewanella* anodes. *Biointerphases*, 10(1), 019013.
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rué, P., Du, Y., Hu, Z., Çağatay, T., Robinson, A. B., Lu, H., Garcia-Ojalvo, J. and Süel, G. M. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18891–18896.
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H. and Roberts, G. P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, 109(1), 167–168.
- Basson, A., Flemming, L. A. and Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. *Microbial Ecology*, 55(1), 1–14.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S. (2001). Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European journal of histochemistry*, 45(1), 39–50.
- Bin Abu Bakar, M., McKimm, J., Haque, S. Z., Majumder, A. A. and Haque, M. (2018). Chronic tonsillitis and biofilms: A brief overview of treatment modalities. *Journal of Inflammation Research, Volume 11*, 329–337.
- Bitas, V., Kim, H.-S., Bennett, J. W. and Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 835–843.
- Blankenship, J. R. and Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: A fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588–594.
- Bodé, S., Fancy, R. and Boeckx, P. (2013). Stable isotope probing of amino sugars - a promising tool to assess microbial interactions in soils: Stable isotope probing of amino sugars. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(12), 1367–1379.
- Boer, W. de, Folman, L. B., Summerbell, R. C. and Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 795–811.
- Boland, T., Latour, R. A. and Stutzenberger, F. J. (2000). Molecular basis of bacterial adhesion.

- Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, 29–41.
- Bonfante, P. and Desirò, A. (2017). Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *The ISME Journal*, 11(8), 1727–1735.
- Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. (2018). Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in colloid and interface science*, 261, 1–14.
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J. A. and Herrera-Estrella, A. H. (2012). Trichoderma: Sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*, 158(1), 3–16.
- Cattò, C. and Cappitelli, F. (2019). Testing anti-biofilm polymeric surfaces: Where to start? *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3794.
- Chen, Q., Yu, J.-J., He, J., Feng, T. and Liu, J.-K. (2022). Isobenzofuranones and isocoumarins from kiwi endophytic fungus *Paraphaeosphaeria sporulosa* and their antibacterial activity against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. *Phytochemistry*, 195, 113050.
- Clausen, C. A. (1996). Bacterial associations with decaying wood: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37(1), 101–107.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3–4), 217–239.
- Cugini, C., Calfee, M. W., Farrow III, J. M., Morales, D. K., Pesci, E. C. and Hogan, D. A. (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 65(4), 896–906.
- Davey, M. E. and O’toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847–867.
- de Siqueira, V. M. and Lima, N. (2011). Efficacy of Free Chlorine Against Water Biofilms and Spores of *Penicillium Brevicompectum*. The Royal Society of Chemistry.
- K. C. Thompson, U. Borchers, K. C. Thompson, U. Borchers and J. Gray (Toim), *Water Contamination Emergencies: Monitoring, Understanding and Acting*. The Royal Society of Chemistry.
- del Barrio-Duque, A., Samad, A., Nybroe, O., Antonielli, L., Sessitsch, A. and Compant, S. (2020). Interaction between endophytic Proteobacteria strains and *Serendipita indica* enhances biocontrol activity against fungal pathogens. *Plant and Soil*, 451, 277–305.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, ... and Wick, L. Y. (2018). Bacterial–fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335–352.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S. and Ianieri, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930–936.
- Do, H., Che, C., Zhao, Z., Wang, Y., Li, M., Zhang, X. and Zhao, X. (2020). Extracellular polymeric substance from *Rahnella* sp. LRP3 converts available Cu into Cu<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub> in soil through biomineralization process. *Environmental Pollution*, 260, 114051.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36.
- Doyle, R. J. (2000). Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and infection*, 2(4), 391–400.
- Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 501–538.
- Ebadzadsahrai, G., Higgins Keppler, E. A., Soby, S. D. and Bean, H. D. (2020). Inhibition of Fungal Growth and Induction of a Novel Volatilome in Response to Chromobacterium

- vaccinii Volatile Organic Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1035.
- Elfazazi, K., Zahir, H., Tankiouine, S., Mayoussi, B., Zanane, C., Lekchiri, S., Ellouali, M., Mliji, E. M. and Latrache, H. (2021). Adhesion behavior of *Escherichia coli* strains on glass: Role of cell surface qualitative and quantitative hydrophobicity in their attachment ability. *International Journal of Microbiology*, 2021.
- Elias, S. and Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 990–1004.
- Epstein, A. K., Pokroy, B., Seminara, A. and Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 995–1000.
- Essig, A., Hofmann, D., Münch, D., Gayathri, S., Künzler, M., Kallio, P. T., Sahl, H.-G., Wider, G., Schneider, T. and Aebi, M. (2014). Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), 34953–34964.
- Farrell, A. and Quilty, B. (2002). Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 316–324.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2001a). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology*, 43(6), 1–8.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2001b). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 9–16.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623–633.
- Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian journal of microbiology*, 23(1), 1–6.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. and Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(4), 583–609.
- Gaddeyya, G., Niharika, P. S., Bharathi, P. and Kumar, P. R. (2012). Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *Advances in Applied Science Research*, 3(4), 2020–2026.
- Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.-P. and Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International journal of food microbiology*, 131(1), 2–9.
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H. and Whyte, F. W. (2002). *The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities*. *Advances in Microbial Physiology*, 46:202-56.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L. and Tolker-Nielsen, T. (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: Genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular microbiology*, 75(4), 815–826.
- Grube, M. and Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal biology reviews*, 23(3), 72–85.
- Gulis, V., Suberkropp, K. and Rosemond, A. D. (2008). Comparison of fungal activities on wood and leaf litter in unaltered and nutrient-enriched headwater streams. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1094–1101.
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P. G., Chen, X., Donose, B. C., Keller, J., Gooding, J. J. and Rabaey,

- K. (2013). Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental science & technology*, 47(13), 7563–7570.
- Gupta, P. and Gupta, P. (2019). Toxic effects of pesticides and agrochemicals. *Concepts and applications in veterinary toxicology: an interactive guide*, 59–82.
- Gupta, P. K. (2018). Toxicity of fungicides. *Veterinary toxicology*, 569–580.
- Haq, I. U., Zhang, M., Yang, P. and van Elsas, J. D. (2014). The interactions of bacteria with fungi in soil: Emerging concepts. *Advances in applied microbiology*, 89, 185–215.
- Harding, M. W., Marques, L. L., Howard, R. J. and Olson, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in microbiology*, 17(11), 475–480.
- Hausner, M. and Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3710–3713.
- Hogan, D. A., Vik, Å. and Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5), 1212–1223.
- Hogan, D. A., Wargo, M. J. and Beck, N. (2009). Bacterial biofilms on fungal surfaces. *Lab-on-a-Chip*, 10(238).
- Hogan Deborah A. (2006). Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(4), 613–619.
- Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W. and Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, 153(10), 3448–3457.
- Hoppe, B., Kahl, T., Karasch, P., Wubet, T., Bauhus, J., Buscot, F. and Krüger, D. (2014). Network Analysis Reveals Ecological Links between N-Fixing Bacteria and Wood-Decaying Fungi. *PLoS ONE*, 9(2), e88141.
- Hu, J., Lin, J., Zhang, Y., Lin, Z., Qiao, Z., Liu, Z., Yang, W., Liu, X., Dong, M. and Guo, Z. (2019). A new anti-biofilm strategy of enabling arbitrary surfaces of materials and devices with robust bacterial anti-adhesion via a spraying modified microsphere method. *Journal of Materials Chemistry A*, 7(45), 26039–26052.
- Ichikawa, T., Hirata, C., Takei, M., Tagami, N., Murasawa, H. and Ikeda, R. (2017). Cell surface hydrophobicity and colony morphology of *Trichosporon asahii* clinical isolates: Cell surface hydrophobicity of *Trichosporon asahii* clinical isolates. *Yeast*, 34(3), 129–137.
- Jagmann, N., von Rekowski, K. S. and Philipp, B. (2012). Interactions of bacteria with different mechanisms for chitin degradation result in the formation of a mixed-species biofilm. *FEMS microbiology letters*, 326(1), 69–75.
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M. and Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology*, 158(3), 708–720.
- Jayasinghearachchi, H. and Seneviratne, G. (2004). Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *Journal of biosciences*, 29(3), 293.
- Jayasinghearachchi, H. and Seneviratne, G. (2010). A mushroom-fungus helps improve endophytic colonization of tomato by *Pseudomonas fluorescens* through biofilm formation. *Research Journal of Microbiology*, 5(7), 689–695.
- Jiao, Y., Tay, F. R., Niu, L. and Chen, J. (2019). Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. *International journal of oral science*, 11(3), 28.
- Kjeldgaard, B., Listian, S. A., Ramaswamhi, V., Richter, A., Kiesewalter, H. T. and Kovács, Á. T. (2019). Fungal hyphae colonization by *Bacillus subtilis* relies on biofilm matrix

- components. *Biofilm*, 1, 100007.
- Kobayashi, D. Y. and Crouch, J. A. (2009). Bacterial/fungal interactions: From pathogens to mutualistic endosymbionts. *Annual review of phytopathology*, 47, 63–82.
- Koch, B., Jensen, L. E. and Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of microbiological methods*, 45(3), 187–195.
- Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Yadav, N., Yadav, A. N., Rastegari, A. A. and Saxena, A. K. (2020). Chapter 18—Microbial biofilms: Functional annotation and potential applications in agriculture and allied sectors. M. K. Yadav & B. P. Singh (Toim), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*, 283–301.
- Krasowska, A. and Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 112.
- Kuchma, S. L. and O’Toole, G. A. (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current opinion in biotechnology*, 11(5), 429–433.
- Lamari, F., Khouadja, S. and Rtimi, S. (2018). Interaction of *Vibrio* to biotic and abiotic surfaces: Relationship between hydrophobicity, cell adherence, biofilm production, and cytotoxic activity. *Surfaces*, 1(1), 187–201.
- Lambertsen, L., Sternberg, C. and Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental microbiology*, 6(7), 726–732.
- Lear, G. and Lewis, G. D. (2012). *Microbial biofilms: Current research and applications*.
- Li, Y.-H., Lau, P. C., Lee, J. H., Ellen, R. P. and Cvitkovitch, D. G. (2001). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *Journal of bacteriology*, 183(3), 897–908.
- Limoli, D. H., Jones, C. J. and Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbial Biofilms*, 223–247.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. and Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 877–896.
- Liu, N. T., Lefcourt, A. M., Nou, X., Shelton, D. R., Zhang, G. and Lo, Y. M. (2013). Native Microflora in Fresh-Cut Produce Processing Plants and Their Potentials for Biofilm Formation. *Journal of Food Protection*, 76(5), 827–832.
- Liu, T., Greenslade, A. and Yang, S. (2017). Levels of rhizome endophytic fungi fluctuate in Paris polyphylla var. Yunnanensis as plants age. *Plant Diversity*, 39(1), 60–64.
- Liu, T., Hua, Z., Han, P., Zhao, Y., Zhou, J., Jin, Y., Li, X., Huang, L. and Yuan, Y. (2022). Mycorrhizosphere Bacteria, *Rhizoglyphus* sp. HPDA25, Promotes the Growth of *Armillaria gallica* and Its Parasitic Host *Gastrodia elata*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 842893.
- López, D., Vlamakis, H. and Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398.
- Lorite, G. S., Rodrigues, C. M., De Souza, A. A., Kranz, C., Mizaikoff, B. and Cotta, M. A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 289–295.
- MacAlpine, J., Robbins, N. and Cowen, L. E. (2023). Bacterial-fungal interactions and their impact on microbial pathogenesis. *Molecular Ecology*, 32(10), 2565–2581.
- Mandolini, E., Probst, M. and Peintner, U. (2021). Methods for studying bacterial–fungal interactions in the microenvironments of soil. *Applied Sciences*, 11(19), 9182.
- Melaugh, G., Hutchison, J., Kragh, K. N., Irie, Y., Roberts, A., Bjarnsholt, T., Diggle, S. P., Gordon, V. D. and Allen, R. J. (2016). Shaping the growth behaviour of biofilms initiated from bacterial aggregates. *PloS one*, 11(3), e0149683.

- Menzler-Hokkanen, I. (2006). Socioeconomic significance of biological control. *An ecological and societal approach to biological control*, 13–25.
- Miquel Guennoc, C., Rose, C., Labbé, J. and Deveau, A. (2018). Bacterial biofilm formation on the hyphae of ectomycorrhizal fungi: A widespread ability under controls? *FEMS Microbiology Ecology*, 94(7).
- Mirani, Z. A., Fatima, A., Urooj, S., Aziz, M., Khan, M. N. and Abbas, T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 21(7), 760.
- Morales, D. K. and Hogan, D. A. (2010). *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000886.
- Morris, C. E. and Monier, J.-M. (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 429–453.
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S. and Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 313(2), 96–102.
- Naskar, A. and Kim, K. (2019). Black phosphorus nanomaterials as multi-potent and emerging platforms against bacterial infections. *Microbial pathogenesis*, 137, 103800.
- Nazir, R., Tazetdinova, D. I. and van Elsas, J. D. (2014). *Burkholderia terrae* BS001 migrates proficiently with diverse fungal hosts through soil and provides protection from antifungal agents. *Frontiers in microbiology*, 5, 598.
- Nazir, R., Warmink, J. A., Boersma, H. and Van Elsas, J. D. (2009). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(2), 169–185.
- Nielsen, M. N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H. C. (1998). Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3563–3569.
- Nützmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schumann, J., Hertweck, C., Strauss, J. and Brakhage, A. A. (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14282–14287.
- O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295–304.
- Partida-Martinez, L. P., Monajembashi, S., Greulich, K.-O. and Hertweck, C. (2007). Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. *Current Biology*, 17(9), 773–777.
- Pawlowska, T. E., Gaspar, M. L., Lastovetsky, O. A., Mondo, S. J., Real-Ramirez, I., Shakya, E. and Bonfante, P. (2018). Biology of Fungi and Their Bacterial Endosymbionts. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 289–309.
- Perry, J. A., Cvitkovitch, D. G. and Lévesque, C. M. (2009). Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: A link between CSP and extracellular DNA. *FEMS microbiology letters*, 299(2), 261–266.
- Pons, L., Délia, M.-L. and Bergel, A. (2011). Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresource technology*, 102(3), 2678–2683.
- Priegnitz, B.-E., Wargenau, A., Brandt, U., Rohde, M., Dietrich, S., Kwade, A., Krull, R. and

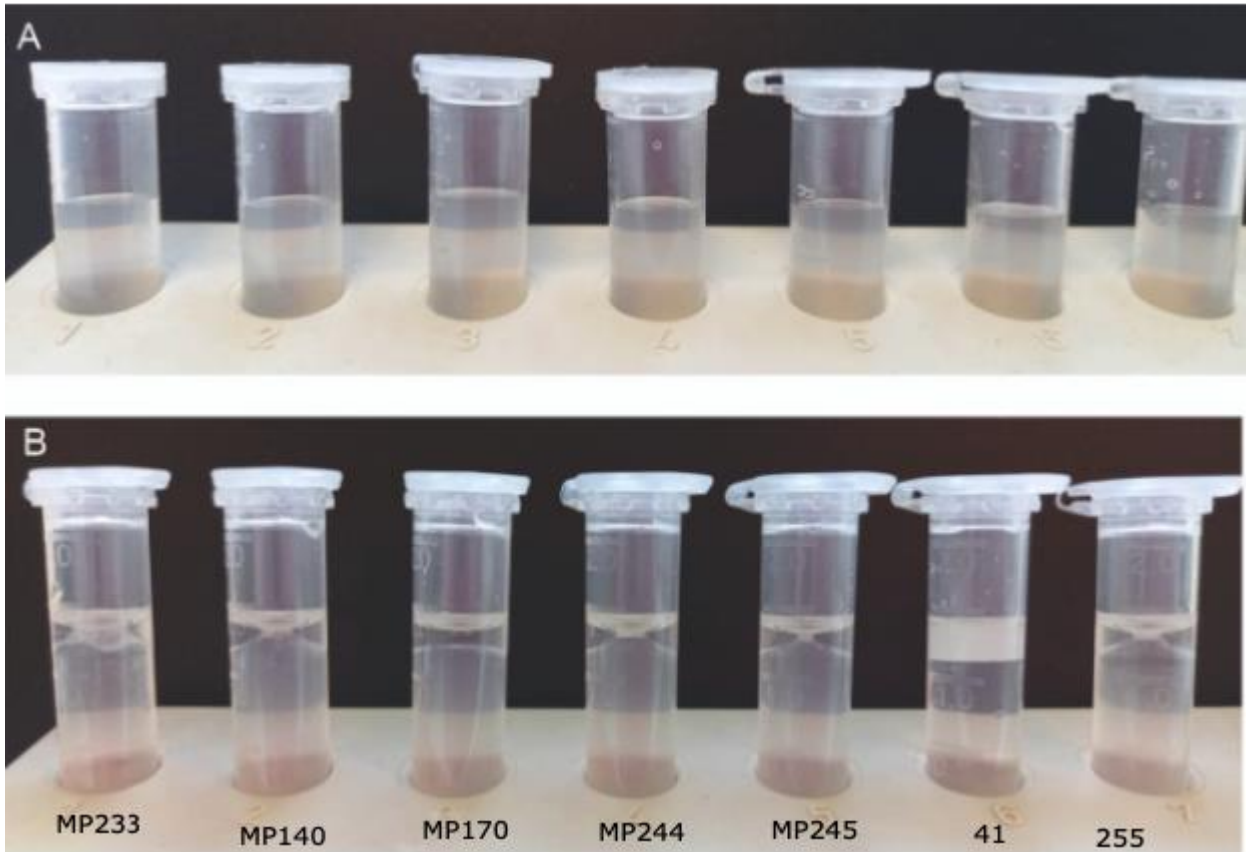
- Fleißner, A. (2012). The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. *Fungal genetics and biology*, 49(1), 30–38.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7213–7223.
- Rajeswari, P. (2019). Combination of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* for the enhanced control of Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* infecting *Arachis hypogaea* L. *Journal of Applied and Natural Science*, 11(1), 138–143.
- Rangel-Castro, J. I., Danell, E. and Pfeffer, P. E. (2002). A <sup>13</sup>C-NMR study of exudation and storage of carbohydrates and amino acids in the ectomycorrhizal edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycologia*, 94(2), 190–199.
- Rella, A., Yang, M. W., Gruber, J., Montagna, M. T., Luberto, C., Zhang, Y.-M. and Del Poeta, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Cryptococcus* Species. *Mycopathologia*, 173(5), 451–461.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29–33.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., De Vroom, E., Van der Marel, G. and Van Boom, J. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279–281.
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., Cenci-Goga, B. T., Lista, F., Fillo, S. and Paparella, A. (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. Isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241–248.
- Rudnick, M. B., van Veen, J. A. and de Boer, W. (2015). Baiting of rhizosphere bacteria with hyphae of common soil fungi reveals a diverse group of potentially mycophagous secondary consumers. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 73–82.
- Römling, U., Gomelsky, M. and Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular microbiology*, 57(3), 629–639.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U. and Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30310–30314.
- Sakthivel, N. and Gnanamanickam, S. (1986). Toxicity of *Pseudomonas fluorescens* towards rice sheath-rot pathogen *Acrocyndrium oryzae* Saw. *Current Science, India*, 55(2), 106–107.
- Scheublin, T. R., Sanders, I. R., Keel, C. and Van Der Meer, J. R. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME journal*, 4(6), 752–763.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A. K., Mygind, P. H. and Raventós, D. S. (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science*, 328(5982), 1168–1172.
- Schneider, T., Senn, M. M., Berger-Bächli, B., Tossi, A., Sahl, H. and Wiedemann, I. (2004). In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 53(2), 675–685.
- Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. and Tarkka, M. T. (2005). Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*, 168(1), 205–216.
- Seneviratne, G., Zavahir, J., Bandara, W. and Weerasekara, M. (2008). Fungal-bacterial biofilms:

- Their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 739–743.
- Simões, L. C., Simões, M. and Lima, N. (2015). Kinetics of biofilm formation by drinking water isolated *Penicillium expansum*. *Biofouling*, 31(4), 349–362.
- Siqueira, V. and Lima, N. (2012). Surface hydrophobicity of culture and water biofilm of *Penicillium* spp. *Current microbiology*, 64, 93–99.
- Siqueira, V. M. and Lima, N. (2013). Biofilm formation by filamentous fungi recovered from a water system. *Journal of Mycology*, 2013.
- Smits, T. H., Wick, L. Y., Harms, H. and Keel, C. (2003). Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. *Environmental microbiology*, 5(2), 85–91.
- Sprague, G. F. and Winans, S. C. (2006). Eukaryotes learn how to count: Quorum sensing by yeast: Figure 1. *Genes & Development*, 20(9), 1045–1049.
- Stanley, C. E., Stöckli, M., Van Swaay, D., Sabotič, J., Kallio, P. T., Künzler, M., deMello, A. J. and Aebi, M. (2014). Probing bacterial–fungal interactions at the single cell level. *Integr. Biol.*, 6(10), 935–945.
- Stanley, N. R. and Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology*, 52(4), 917–924.
- Steffan, B. N., Venkatesh, N. and Keller, N. P. (2020). Let's get physical: Bacterial-fungal interactions and their consequences in agriculture and health. *Journal of Fungi*, 6(4), 243.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S. and Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 361–367.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209.
- Sun, Z.-B., Li, S.-D., Ren, Q., Xu, J.-L., Lu, X. and Sun, M.-H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of applied microbiology*, 129(3), 486–495.
- Tal, N., Tal, M., Sapir, R. and Osherov, N. (2016). Mechanisms of Bacterial (*Serratia marcescens*) Attachment to, Migration along, and Killing of Fungal Hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2585–2594.
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T. R., Revsbech, N. P. and Meyer, R. L. (2013). Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: A quantitative study. *FEMS microbiology ecology*, 86(3), 394–403.
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D. and Promputtha, I. (2020). Fungi vs. Fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 604923.
- Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K. and Finlay, R. D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 34–40.
- Triveni, S., Prasanna, R., Kumar, A., Bidyarani, N., Singh, R. and Saxena, A. K. (2015). Evaluating the promise of *Trichoderma* and *Anabaena* based biofilms as multifunctional agents in *Macrophomina phaseolina*-infected cotton crop. *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 656–670.
- Triveni, S., Prasanna, R. and Saxena, A. K. (2012). Optimization of conditions for in vitro development of *Trichoderma viride*-based biofilms as potential inoculants. *Folia microbiologica*, 57, 431–437.
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E. and Jaroszuk-Ścisiel, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329.

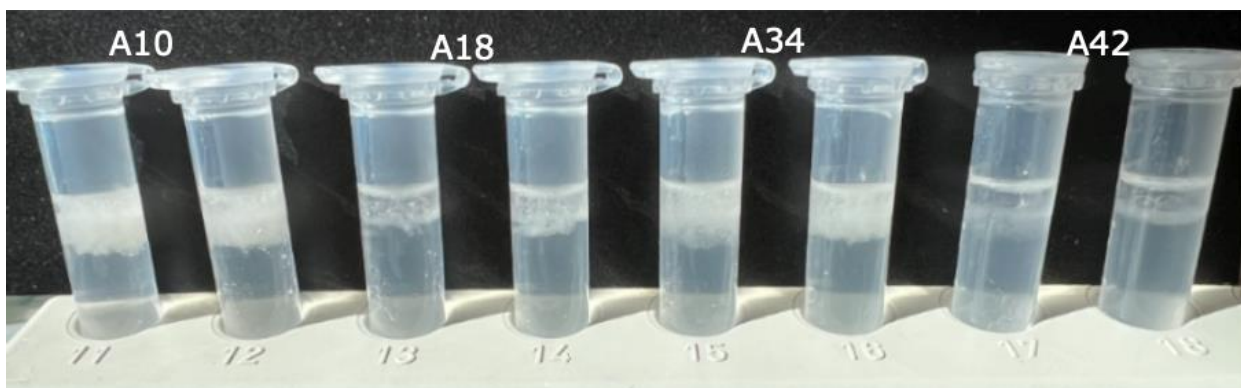
- van der Mei, H. C., Cowan, M. M. and Busscher, H. J. (1991). Physicochemical and structural studies on *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 and MR-481—Two standard strains in hydrophobicity tests. *Current Microbiology*, 23, 337–341.
- Van Loosdrecht, M. C., Norde, W. and Zehnder, A. (1990). Physical chemical description of bacterial adhesion. *Journal of biomaterials applications*, 5(2), 91–106.
- van Overbeek, L. S. and Saikkonen, K. (2016). Impact of bacterial–fungal interactions on the colonization of the endosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 230–242.
- Velmourougane, K., Prasanna, R. and Saxena, A. K. (2017). Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. *Journal of basic microbiology*, 57(7), 548–573.
- Venturi, V. and Keel, C. (2016). Signaling in the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 187–198.
- Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M. and Stielow, J. B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* ( *Ascomycota* ). *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32(1), 25–51.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535–2554.
- Wang, M. and Tang, T. (2019). Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of orthopaedic translation*, 17, 42–54.
- Wang, Y., Wang, L., Suo, M., Qiu, Z., Wu, H., Zhao, M. and Yang, H. (2022). Regulating Root Fungal Community Using *Mortierella alpina* for *Fusarium oxysporum* Resistance in *Panax ginseng*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 850917.
- Whiteford, J. R. and Spanu, P. D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants: Hydrophobins and fungus-plant interactions. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 391–400.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. and Greenberg, E. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860–864.
- Wolfe, A. J. and Visick, K. L. (2008). Get the message out: Cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of bacteriology*, 190(2), 463–475.
- Worrich, A., Stryhanyuk, H., Musat, N., König, S., Banitz, T., Centler, F., Frank, K., Thullner, M., Harms, H. and Richnow, H.-H. (2017). Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nature Communications*, 8(1), 15472.
- Yazdi, S. and Ardekani, A. M. (2012). Bacterial aggregation and biofilm formation in a vortical flow. *Biomicrofluidics*, 6(4), 044114.

## LISAD

**LISA 1.** MATH test uuritud bakteritega. (A) - bakterite suspensioonid enne heksadekaani (B) lisamist. MP233 - *P. helleri*; MP140 - *P. trivialis*; MP170 - *P. yamanorum*; MP244 - *P. fluorescens*; MP245 - *Rahnella* sp.; 41 - *Rouxiella* sp.; 255 - *P. koreensi*.



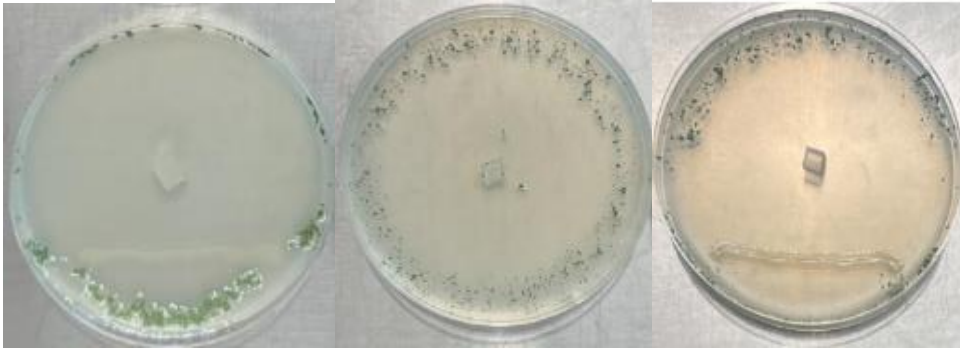
**LISA 2.** Mikroseeite hüdfoobsus heksadekaaniga: A10 – *Mortierella alpina*; A18 – *Clonostachys rosea*; A34 – *Trichoderma* sp.; A42 – *Paraphaeosphaeria sporulosa*.



**LISA 3.** Vastandamiskatsete näidispildid R2A söötmel.

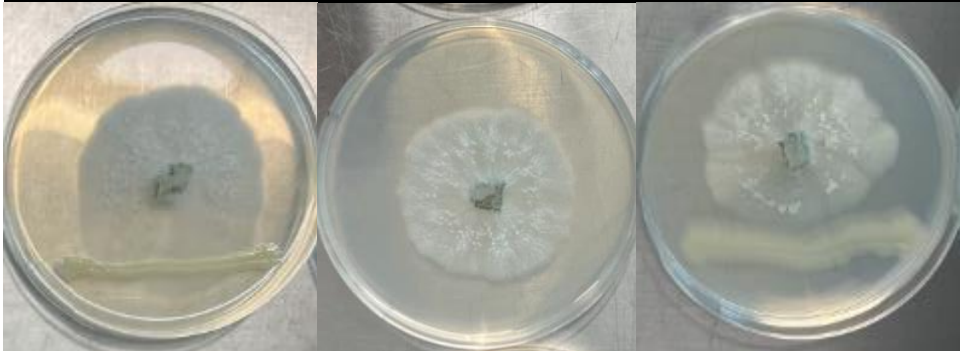
**A**

<i>Trichoderma</i> sp. A34		
<i>P. trivialis</i> MP140		<i>Rahnella</i> sp. MP245

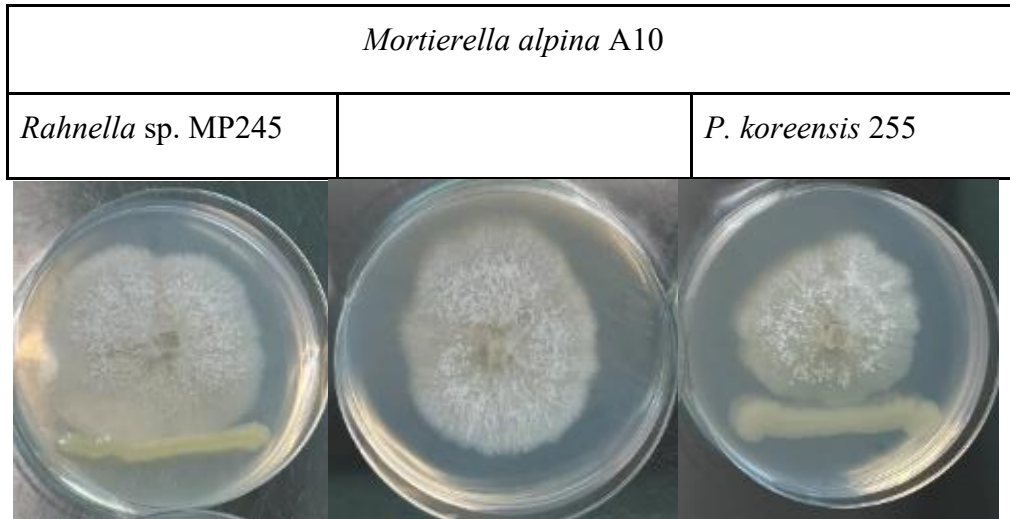


**B**

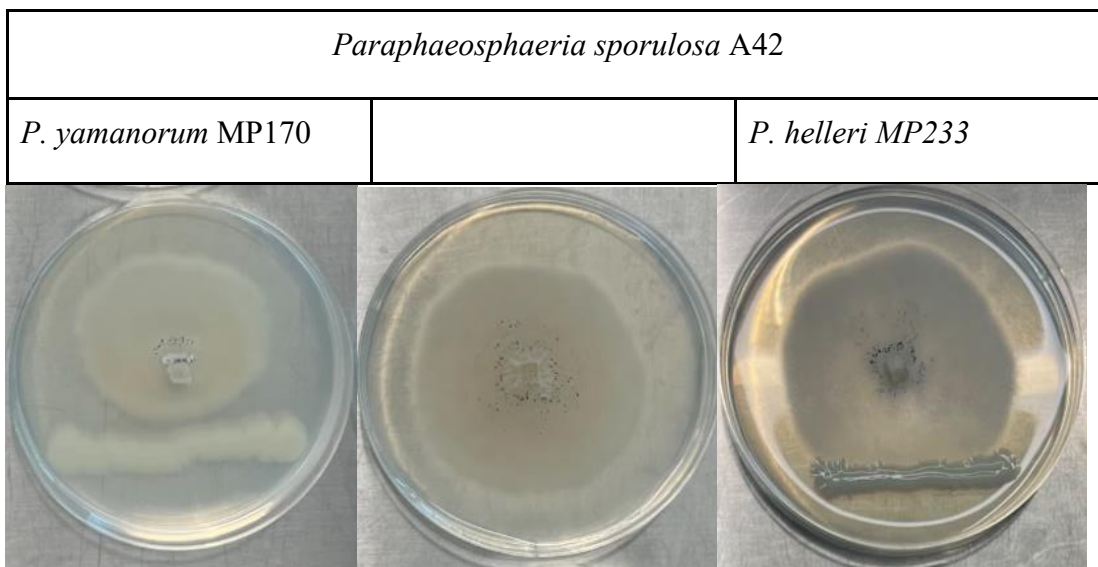
<i>Clonostachys rosea</i> A18		
<i>Rahnella</i> sp. MP245		<i>P. yamanorum</i> MP170



C



D



**LISA 4.** Bakteri inhibeeriv mõju (%) seente kasvule R2A söötmel.

	<i>Mortierella alpina</i> A10	<i>Clonostachys rosea</i> A18	<i>Trichoderma sp.</i> A34	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> A42
<i>Pseudomonas trivialis</i> MP140	11	4.1	0.0	22.2
<i>Pseudomonas yamanorum</i> MP170	15	6.2	0.0	25.6
<i>Pseudomonas helleri</i> MP233	6.9	-1.4	0.0	-1.7
<i>Rouxiella sp.</i> 41	16.7	11	0.0	26.1
<i>Rahnella sp.</i> MP245	0	-37.7	0.0	2.8
<i>Pseudomonas koreensis</i> 255	22	14.4	0.0	22.2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MP244	4.6	0.7	0.0	5.7

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Helery Hindriksoo (sünnikuupäev 10.01.2001)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Bakterite kinnitumine mikrosete niidistikule biofilmi näitel**, mille juhendajateks on PhD Mari Pent ja PhD Merike Jõesaar,
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Helery Hindriksoo

29.05.2023